

Université de Sherbrooke

**Régulation du cycle cellulaire dans le renouvellement  
de l'épithélium intestinal**

Par

**Claude Deschênes**

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de  
Philosophae Doctor (Ph. D.) en Biologie Cellulaire

Novembre 2003



National Library  
of Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

Acquisitions et  
services bibliographiques

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 0-612-90571-3*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 0-612-90571-3*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this dissertation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de ce manuscrit.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the dissertation.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

**Canada**

Université de Sherbrooke

**Régulation du cycle cellulaire dans le renouvellement  
de l'épithélium intestinal**

Par

**Claude Deschênes**

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de

Philosophae Doctor (Ph. D.) en Biologie Cellulaire

Novembre 2003

**RÉSUMÉ**

L'épithélium intestinal est un tissu en continuel renouvellement. Son unité fonctionnelle, l'axe-crypte villosité, est composée de deux compartiments soit la crypte, où l'on retrouve des cellules prolifératives et en voie de différenciation, et la villosité, où l'on retrouve des cellules pleinement différenciées et fonctionnelles. Le contrôle de la prolifération et de la différenciation est un élément très important dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

Un des mécanismes permettant le contrôle de la prolifération est le cycle cellulaire. La progression à travers les différentes phases du cycle se fait sous le contrôle de l'assemblage bien spécifique de différents complexes cyclines/cdks. L'activation des complexes cyclines/cdks de la phase G1, soit les complexes cycline D/cdk4(6) et cycline E/cdk2, vont permettre la phosphorylation des protéines de la famille Rb (pRb, p107 et p130). Sous leur forme hypophosphorylées, ces protéines sont associées aux facteurs de transcription E2F. Lorsqu'elles sont phosphorylées, elles vont relâcher ces facteurs de transcription et ainsi permettre l'activation de leurs gènes cibles qui sont surtout des protéines nécessaires à l'entrée en phase S du cycle. Le contrôle de l'état de phosphorylation des protéines de la famille Rb est donc un élément très important dans le contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire. Il existe des protéines, qu'on appelle inhibiteurs du cycle cellulaire, qui sont capables d'inhiber l'activité des complexes cyclines/cdks et ainsi contrôler l'état de phosphorylation des protéines de la famille Rb.

Pour entamer leur processus de différenciation terminale, les cellules intestinales doivent cesser de proliférer, donc arrêter leur cycle cellulaire en phase G1. Le premier manuscrit de cette thèse rapporte les mécanismes utilisées par les cellules intestinales pour cesser leur prolifération et entamer leur programme de différenciation entérocytaire. Cet article démontre l'importance des inhibiteurs de la famille Cip/Kip (p21, p27 et p57) dans l'arrêt du cycle cellulaire des cellules Caco-2/15. Par la technique des antisens, un rôle dans le processus de différenciation a aussi été démontré pour p27, un rôle autre que celui d'inhibiteur du cycle cellulaire. En effet, ces cellules exprimant l'antisens de p27

montrent une diminution dans l'expression et l'activité de marqueurs de différenciation fonctionnels tels que la sucrase-isomaltase et la phosphatase alcaline, mais aussi structuraux tel que la villine.

Le deuxième article de cette thèse s'intéresse à la régulation de l'expression des facteurs de transcription E2F et des protéines de la famille Rb dans les cellules intestinales HIEC. Cet article a permis de démontrer que le facteur de transcription E2F4 joue un rôle très important dans la prolifération de ces cellules. Ces études ont aussi permis de mettre en lumière un mécanisme de régulation de l'activité transcriptionnelle d'E2F4. Il semble, en effet, que l'état de phosphorylation d'E2F4 peut moduler sa localisation cellulaire et que cette phosphorylation varie selon la phase du cycle cellulaire. Des résultats démontrent que l'activité de la MAPK p38 joue un rôle dans le contrôle de la localisation cellulaire d'E2F4.

Finalement, le troisième manuscrit relate le rôle des C/EBP dans l'inflammation et la prolifération des cellules intestinales. Trois isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$ ) semblent impliquées dans la régulation de l'expression de l'haptoglobine. Cependant, la surexpression des isoformes C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  LAP affecte négativement la prolifération des cellules intestinales IEC-6. En effet, la surexpression de l'isoforme LAP retarde l'entrée en phase S du cycle cellulaire en modulant l'expression de certaines protéines du cycle cellulaire comme les cyclines D1, D2 et E ainsi que l'inhibiteur du cycle cellulaire p27. L'inhibition de prolifération amenée par C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  LAP pourrait être expliquée par une augmentation de l'association entre ses protéines et E2F4 et qui aurait pour conséquence une diminution de la transcription dépendante d'E2F.

En résumé, ces travaux permettent une meilleure compréhension de la régulation de l'expression et de la localisation cellulaire des protéines du cycle cellulaire dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales.



# TABLE DES MATIÈRES

|  |     |
|--|-----|
| <b><u>TABLE DES MATIÈRES</u></b>   | I   |
| <b><u>LISTE DES ILLUSTRATIONS</u></b>  | III |
| <b><u>LISTE DES ABRÉVIATIONS</u></b>   | IV  |
| <b><u>RÉSUMÉ</u></b>   |     |
| <b><u>INTRODUCTION</u></b>   | 1   |
| <b>1. LE SYSTÈME DIGESTIF</b>  | 1   |
| 1.1 <i>Les couches tissulaires du tube digestif</i>  | 1   |
| 1.2 <i>La digestion</i>  | 4   |
| 1.3 <i>Le renouvellement de l'épithélium intestinal</i>  | 8   |
| <b>2. LE CYCLE CELLULAIRE</b>  | 9   |
| 2.1 <i>Les complexes cyclines/cdks</i>   | 12  |
| 2.1.1 <i>Mécanismes d'activation des complexes cyclines/cdks</i>   | 15  |
| 2.1.2 <i>Mécanismes d'inactivation des complexes cyclines/cdks</i>   | 15  |
| 2.2 <i>Les inhibiteurs du cycle cellulaire</i>   | 16  |
| 2.2.1 <i>La famille des Ink4</i>   | 17  |
| 2.2.2 <i>La famille des Cip/Kip</i>  | 18  |
| 2.3 <i>Contrôle de la transition G1/S</i>  | 22  |
| 2.3.1 <i>Les protéines de la famille Rb</i>  | 22  |
| 2.3.2 <i>Les facteurs de transcription E2F</i>   | 26  |
| 2.3.2.1 <i>Régulation de l'activité transcriptionnelle par les protéines de la famille Rb</i>                                      | 27  |
| 2.3.2.2 <i>Autres mécanismes de contrôle de l'activité transcriptionnelle</i>  | 29  |
| 2.4 <i>Régulation des protéines du cycle cellulaire par les voies de signalisation dans les cellules épithéliales intestinales</i> | 31  |
| <b>3. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION C/EBP</b>  | 32  |
| 3.1 <i>Rôle dans l'inflammation</i>  | 36  |
| 3.2 <i>Rôle dans la prolifération cellulaire</i>   | 38  |
| 3.3 <i>Implication dans le processus de différenciation adipocytaire</i>   | 39  |
| <b>4. OBJECTIFS</b>  | 41  |

|  |    |
|--|----|
| <b><u>RÉSULTATS</u></b>  | 43 |
| <b><u>Article 1</u></b>  | 43 |
| Role of p27 <sup>Kip1</sup> in human intestinal cell differentiation.  |    |
| <b><u>Article 2</u></b>  | 44 |
| The nucleocytoplasmic shuttling of E2F4 is involved in the regulation of human intestinal epithelial cell proliferation and differentiation. |    |
| <b><u>Article 3</u></b>  | 45 |
| Role of specific CCAAT/Enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells.   |    |
| <b><u>DISCUSSION</u></b>   | 46 |
| <b><u>REMERCIEMENTS</u></b>  | 68 |
| <b><u>RÉFÉRENCES</u></b>   | 69 |

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figure 1 : Les organes du système digestif</b>   | <b>2</b>  |
| <b>Figure 2 : Représentation des couches tissulaires au niveau de l'intestin grêle</b>    | <b>6</b>  |
| <b>Figure 3 : Les différentes phases du cycle cellulaire</b>                              | <b>10</b> |
| <b>Figure 4 : Mécanismes d'activation et d'inactivation des complexes cyclines/cdks</b>   | <b>14</b> |
| <b>Figure 5 : Représentation schématique des différents facteurs de transcription E2F</b> | <b>25</b> |
| <b>Figure 6 : Modèle de la modulation de la transcription par pRb</b>                     | <b>28</b> |
| <b>Figure 7 : Représentation schématique des différentes isoformes des C/EBP</b>          | <b>34</b> |

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

|               |   |
|---------------|---|
| AMP           | Adénosine monophosphate                                 |
| AMPC          | <i>AMP cyclique</i>                                     |
| bZIP          | <i>Basic leucine zipper</i>                             |
| CAK           | <i>Cdk activating kinase</i>                            |
| C/EBP         | <i>CCAAT/Enhancer-Binding Protein</i>                   |
| Cdk           | <i>Cyclin-dependent kinase</i>                          |
| Chk2          | <i>Checkpoint kinase 2</i>                              |
| Cip           | <i>CDK-interacting protein</i>                          |
| DPPIV         | Dipeptidyl peptidase IV                                 |
| HDAC          | Histone désacétylase                                    |
| DHFR          | Dihydrofolate réductase                                 |
| DP            | <i>DRTF1 protein</i>                                    |
| DRTF1         | <i>Differentiation-regulated transcription factor 1</i> |
| E2F           | <i>E2A binding factor</i>                               |
| EGF           | <i>Epidermal Growth Factor</i>                          |
| GSK-3 $\beta$ | <i>Glycogen Synthase Kinase-3<math>\beta</math></i>     |
| HIEC          | <i>Human Intestinal Epithelial Cells</i>                |
| IL-1 $\beta$  | Interleukin-1 $\beta$                                   |
| IL-6          | Interleukin-6   |
| IL-8          | Interleukin-8   |

|                |  |
|----------------|--|
| IL-12          | Interleukin-12   |
| INF- $\gamma$  | Interféron- $\gamma$                                       |
| Ink4           | <i>Inhibitor of cdk4</i>                                   |
| Kip            | <i>Kinase inhibitory protein</i>                           |
| LAP            | <i>Liver activating protein</i>                            |
| LIP            | <i>Liver inhibitory protein</i>                            |
| LPS            | <i>Lipopolysaccharides</i>                                 |
| MAPK           | <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>                    |
| MBP            | <i>Myelin Basic Protein</i>                                |
| NES            | <i>Nuclear export sequence</i>                             |
| NF- $\kappa$ B | <i>Nuclear factor-Kappa B</i>                              |
| NGF            | <i>Nerve Growth factor</i>                                 |
| NLS            | <i>Nuclear localization sequence</i>                       |
| PCDE           | <i>Primary Culture of human Differentiated Enterocytes</i> |
| PCNA           | <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>                  |
| PDGF           | <i>Platelet-derived growth factor</i>                      |
| PEST           | Proline (P) Acide glutamique (E) Sérine (S) Thréonine (T)  |
| PI-3K          | <i>Phosphatidylinositol-3 kinase</i>                       |
| PKA            | Protéine Kinase A  |
| PKC            | Protéine Kinase C  |
| PP1            | Protéine phosphatase 1                                     |
| PP2A           | Protéine phosphatase 2A                                    |
| PPAR           | <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>          |

|             |  |
|-------------|--|
| PRAK        | <i>p38 regulated/activated protein kinase</i>        |
| pRb         | <i>Protéine du rétinoblastome</i>                    |
| SAA         | Sérum amyloïde A                                     |
| TCF         | <i>T-Cell Factor</i>                                 |
| TGF $\beta$ | <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> |
| TNF         | <i>Tumor necrosis factor</i>                         |

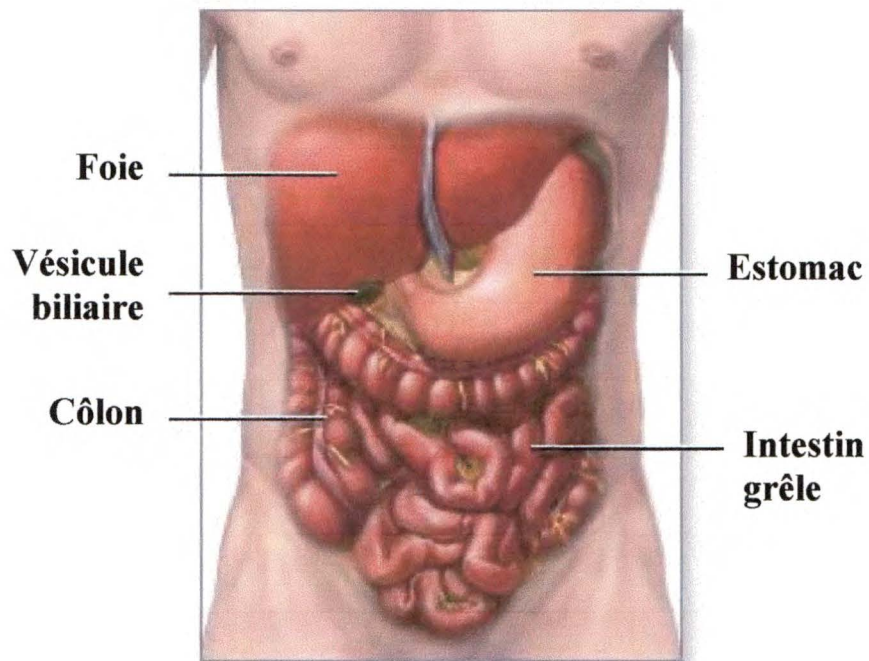
# INTRODUCTION

## 1- LE SYSTÈME DIGESTIF

L'appareil digestif est chargé de l'assimilation physique et chimique des aliments. L'énergie dont le corps a besoin ainsi que les matières premières indispensables à la croissance et à la réparation des structures organiques nous sont entièrement fournies par ce que nous mangeons et buvons. Le système digestif comprend deux groupes d'organes : le tube digestif et les organes digestifs annexes. Le tube digestif est un conduit qui s'étend sans interruption de la bouche à l'anus. Les organes du tube digestif sont la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon, le rectum et l'anus. Sa longueur est d'environ 9 m. Les organes digestifs annexes comprennent les dents, la langue, les glandes salivaires, le pancréas, le foie, la vésicule biliaire et leurs canaux respectifs (Figure 1). Chacun de ces organes joue un rôle important dans la digestion des aliments. Le système digestif accomplit six grandes fonctions : 1- l'ingestion des aliments; 2- la sécrétion d'eau, d'acide, de tampons et d'enzymes nécessaires à la digestion; 3- le brassage et la propulsion des aliments; 4- la digestion; 5- l'absorption et 6- la défécation (Tortora et Grabowski, 2001).

### *1.1 Les couches tissulaires du tube digestif*

La paroi du tube digestif possède une structure uniforme composée de quatre couches de tissus qui sont, de l'intérieur vers l'extérieur, la muqueuse, la sous-muqueuse,



**Figure 1**

**Les organes du système digestif**

Lorsqu'ingérés, les aliments vont parcourir le trajet suivant le long du système digestif. De la bouche, ils vont passer à l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon, l'anus et le rectum. La digestion et l'absorption s'effectuent majoritairement au niveau de l'intestin grêle. D'autres organes annexes vont aussi participer à ce processus comme le pancréas, le foie et la vésicule biliaire. (Tiré et modifié de [www.iweightloss.com/digest\\_a\\_meal.htm](http://www.iweightloss.com/digest_a_meal.htm))



la musculature et la séreuse (Figure 2). La muqueuse, qui est en contact avec la lumière du tube digestif, est formée de trois couches : un épithélium qui est en contact avec le contenu du tube digestif; une couche sous-jacente de tissu conjonctif lâche (chorion) et une couche mince de muscle lisse. L'épithélium de la bouche, de l'œsophage et du canal anal est principalement de type stratifié pavimenteux non kératinisé et joue un rôle protecteur. Un épithélium simple tapisse l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. Le chorion est formé de tissu conjonctif lâche et contient plusieurs vaisseaux sanguins et lymphatiques qui sont les voies par lesquelles les nutriments absorbés vont atteindre les autres tissus du corps. Cette couche soutient l'épithélium et l'attache à la *muscularis mucosae*. La *muscularis mucosae* est une couche mince de fibres musculaires. Elle fronce la muqueuse de l'estomac et de l'intestin grêle formant ainsi un grand nombre de plis. Grâce à ses mouvements, toutes les cellules absorbantes sont exposées au contenu du tube digestif. La sous-muqueuse est une couche composée de tissu conjonctif lâche qui fixe la muqueuse à la musculature. Elle est richement vascularisée. Ensuite, la musculature est une couche de tissu musculaire. La musculature de la bouche, de l'œsophage et du sphincter externe de l'anus comprend du tissu musculaire squelettique. Ailleurs, la musculature comprend du tissu musculaire lisse. Les contractions involontaires du muscle lisse permettent la fragmentation des aliments. Finalement, la séreuse est la couche la plus externe des parties du tube digestif. Elle est composée de tissu conjonctif (Tortora et Grabowski, 2001).

## *1.2 La digestion*

La digestion des aliments commence au niveau de la bouche. Deux types de digestions sont retrouvées : la digestion mécanique et la digestion chimique. La mastication des aliments avec la bouche représente la digestion mécanique. Les aliments sont ainsi transformés en une substance appelée bol alimentaire. La digestion chimique est effectuée par la salive. En effet, la dégradation de l'amidon commence dans la bouche grâce à une enzyme présente dans la salive, l'amylase salivaire. De la bouche, le bol alimentaire va ensuite passer du pharynx à l'œsophage. L'œsophage sécrète le mucus et transporte la nourriture à l'estomac où va se poursuivre le processus de digestion (Tortora et Grabowski, 2001).

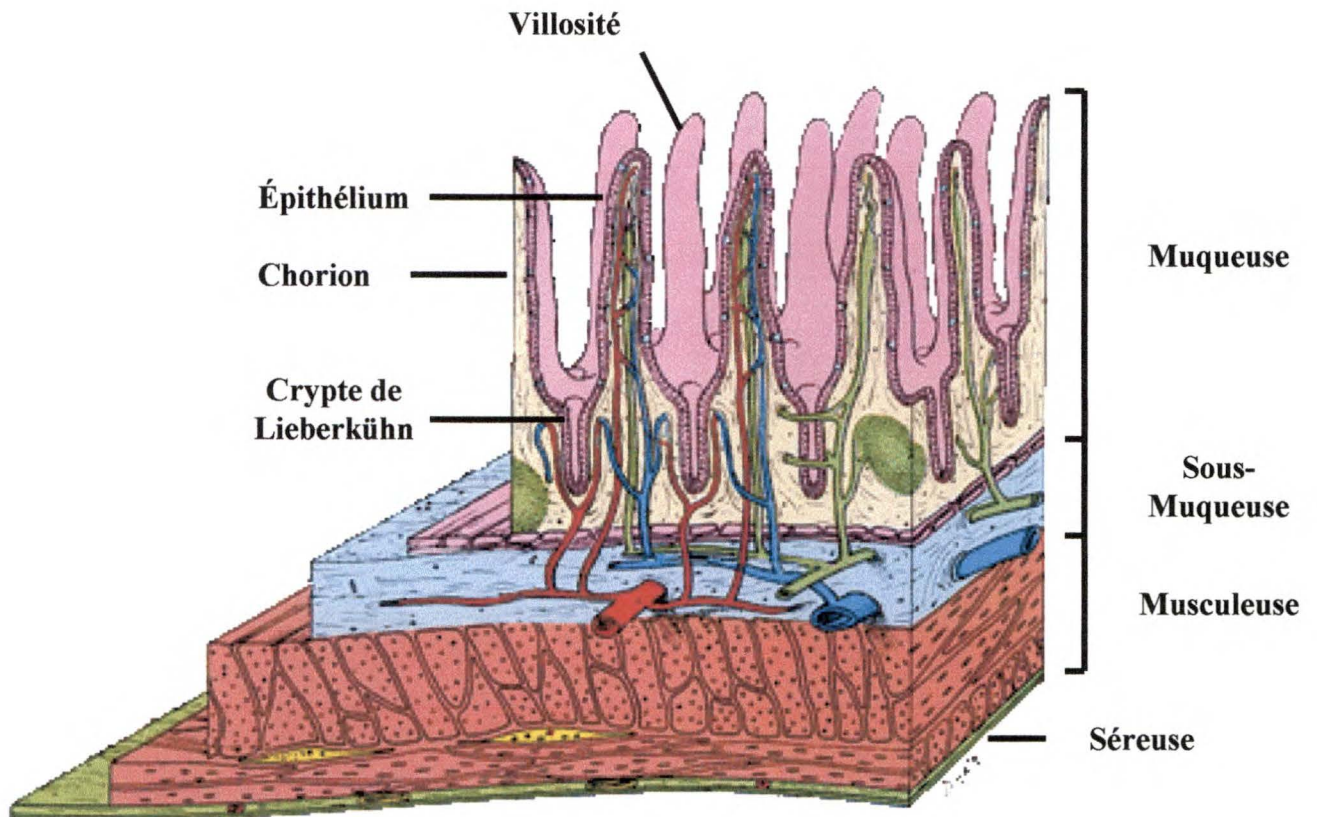
L'estomac est l'organe qui relie l'œsophage et l'intestin grêle. Une de ses principales fonctions est de former un réservoir où la nourriture peut être retenue et malaxée. Le mélange de la nourriture aux sécrétions des glandes gastriques réduisent cette dernière en bouillie appelée chyme. La digestion de l'amidon se poursuit dans l'estomac alors que celle des protéines et des triglycérides commence grâce à des enzymes comme la pepsine et la lipase gastrique. Peu d'absorption s'effectue dans l'estomac. Cependant, certaines cellules peuvent absorber une certaine quantité d'eau, d'ions et d'acides gras à chaînes courtes (Tortora et Grabowski, 2001).

De l'estomac, le chyme passe ensuite à l'intestin grêle où continue le processus de digestion. Cependant, la bonne digestion des aliments est liée à trois autres organes digestifs annexes soit le pancréas, le foie et la vésicule biliaire. Le pancréas est une glande située derrière l'estomac. Il est relié au duodénum par un conduit appelé canal

pancréatique. C'est par ce canal que les sécrétions pancréatiques passeront au niveau du duodénum. Le pH légèrement alcalin du suc pancréatique amène l'inactivation de la pepsine de l'estomac et permet aussi de rétablir le pH à un niveau approprié pour les réactions enzymatiques effectuées dans l'intestin grêle. Plusieurs enzymes sont présentes dans le suc pancréatique. L'amylase pancréatique va permettre la digestion des glucides, la trypsine, la chymotrypsine, la carboxypeptidase et l'élastase vont s'attaquer aux protéines alors que la lipase pancréatique va permettre la digestion des triglycérides. Le foie et la vésicule biliaire sont, quant à eux, impliqués dans l'absorption des lipides. En effet, le foie produit de grandes quantités de bile et cette bile peut être emmagasinée dans la vésicule biliaire. Cette bile va se retrouver dans l'intestin grêle via le conduit cholédoque. La bile joue un rôle dans l'émulsification des lipides et leur absorption après la digestion (Tortora et Grabowski, 2001).

Ces principales étapes de la digestion et de l'absorption se déroulent dans un long tube appelé intestin grêle. En fait, les principales fonctions de l'intestin grêle sont la digestion et l'absorption des glucides, des protéines et des lipides. Environ 90% des nutriments sont absorbés dans l'intestin grêle. La structure de cet organe est particulièrement bien adaptée à ses fonctions. Sa seule longueur procure une grande surface pour la digestion et l'absorption et elle est augmentée par des plis circulaires, des villosités et au niveau cellulaire, des microvillosités (Tortora et Grabowski, 2001).

L'intestin grêle commence au sphincter pylorique de l'estomac et débouche sur le côlon. Il comprend trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le duodénum est le segment le plus court et s'étend du sphincter pylorique de l'estomac au jéjunum. Il mesure environ 25 cm. Le jéjunum est d'une longueur approximative de 1 m et aboutit à l'iléon le



**Figure 2**

**Représentation des couches tissulaires au niveau de l'intestin grêle**

Quatre couches tissulaires sont présentes dans l'intestin grêle soit la séreuse, la musculature, la sous-muqueuse et la muqueuse. La muqueuse est formée de trois couches : l'épithélium, le tissu conjonctif et une couche mince de muscle lisse. L'épithélium de l'intestin grêle comporte des villosités où l'on retrouve les cellules différenciées et des cryptes où l'on retrouve les cellules prolifératives. (Tiré et modifié de Tortora et Grabowski, 2001)

dernier segment. Ce dernier mesure environ 2 m et se termine au côlon (Tortora et Grabowski, 2001).

Les quatre couches tissulaires sont présentes dans l'intestin grêle, mais avec certaines particularités. En effet, la muqueuse forme des villosités qui sont des saillies digitiformes. Le grand nombre de ces villosités augmente énormément la surface de l'épithélium disponible pour l'absorption et la digestion. Chaque villosité est formée, au centre, d'un prolongement du chorion dans lequel sont enchâssés une artériole, une veinule, un réseau de capillaires sanguins et un canal lymphatique. Les nutriments absorbés par les cellules épithéliales qui recouvrent les villosités peuvent donc entrer dans le sang ou la lymphe. L'épithélium présente aussi de nombreuses invaginations appelées cryptes de Lieberkühn (Figure 2) (Tortora et Grabowski, 2001).

L'épithélium de la muqueuse intestinal est de type simple prismatique. Il est composé principalement de cellules absorbantes (entérocyte), de cellules caliciformes (Goblet), de cellules entéroendocrines et de cellules de Paneth. Les quatre types cellulaires retrouvés au niveau de l'épithélium intestinal ont chacun un rôle spécifique. Le principal type cellulaire retrouvé est la cellule absorbante (entérocyte). La membrane apicale des entérocytes présente des microvillosités, formant une structure complexe appelée bordure en brosse. Ces structures augmentent la surface d'absorption des nutriments. Elles contiennent aussi plusieurs enzymes ayant des fonctions digestives. Les cellules caliciformes, quant à elles, produisent une sécrétion riche en mucopolysaccharides et en glycoprotéines appelée mucus. Les cellules entéroendocrines, qui représentent environ 0.5% des cellules de l'intestin, sécrètent pour leur part plusieurs peptides et polypeptides comme la sécrétine et la cholécystokinine alors que les cellules de Paneth

sécrètent entre autres le lysozyme, une enzyme bactéricide. Elle sont aussi capables de phagocytose (Karam,1999; Tortora et Grabowski, 2001).

Les sucs pancréatique et intestinal favorisent l'absorption des substances du chyme qui entrent en contact avec les microvillosités. Une partie de la digestion enzymatique s'effectue à la surface des cellules épithéliales qui tapissent les villosités à cause des enzymes de la bordure en brosse insérées dans la membrane plasmique des microvillosités plutôt que dans la lumière seulement. La digestion des glucides va se faire grâce à des enzymes comme l' $\alpha$ -dextrinase, la maltase, la sucrase-isomaltase et la lactase alors que la digestion des protéines va se faire via les peptidases (aminopeptidase et dipeptidase). Tous les processus de digestion effectués le long du tube digestif ont pour but de donner aux aliments une forme qui leur permette de traverser les cellules épithéliales et de passer dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ce passage des nutriments est appelé absorption. L'absorption s'effectue principalement dans l'intestin grêle par diffusion simple, diffusion facilitée, osmose et transport actif (Tortora et Grabowski, 2001).

Finalement, le côlon constitue la partie terminale du tube digestif. Ses principales fonctions consistent à finir l'absorption, produire certaines vitamines et former les fèces pour les expulser du corps (Tortora et Grabowski, 2001).

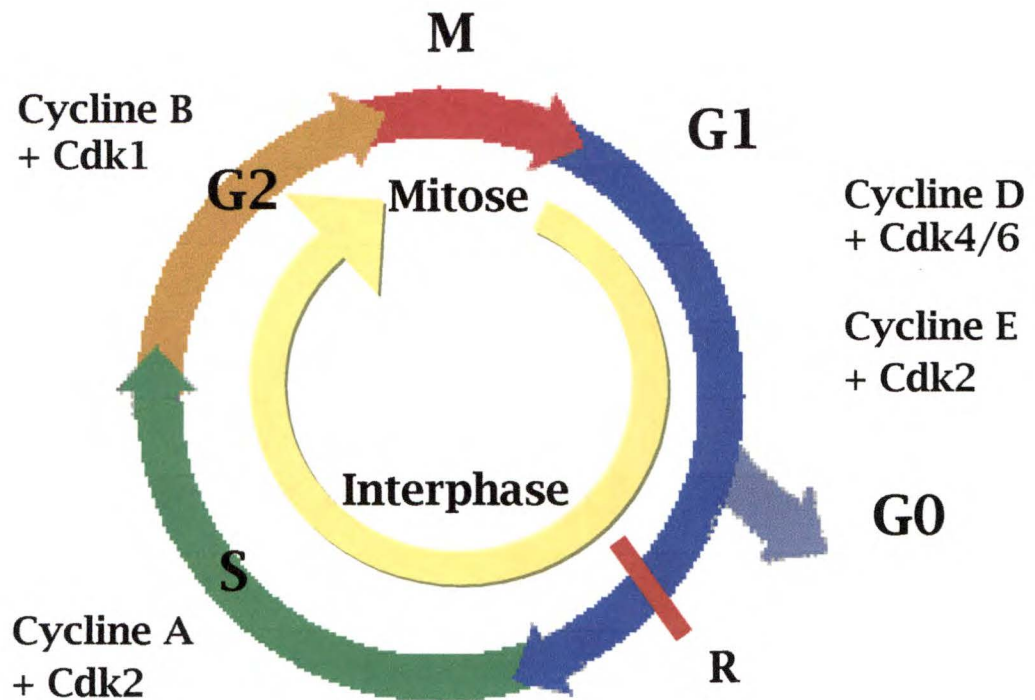
### *1.3 Le renouvellement de l'épithélium intestinal*

L'épithélium intestinal est un tissu en continuuel renouvellement. Son unité fonctionnelle, l'axe crypte-villosité, est composée de deux compartiments cellulaires bien distincts. C'est au niveau de la crypte que sont retrouvées les cellules prolifératives. En

fait, tout au fond de cette crypte, on retrouve des cellules souches pluripotentes qui vont se diviser et former des cellules filles prolifératives et déterminées (Potten et Loeffler, 1990). Au tiers supérieur de la crypte, ces cellules vont cependant cesser de proliférer pour acquérir leur phénotype différencié lors de leur entrée dans la villosité. À l'extrémité de la villosité, les cellules sont expulsées dans la lumière intestinale. Le renouvellement de l'épithélium intestinal se fait tous les 4-5 jours (Haubrich et al., 1995). Tel que mentionné plus tôt, quatre types cellulaires peuvent être générés par les cellules prolifératives de la crypte : les entérocytes, les cellules de Goblet, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth. Toutes ces cellules différenciées sont retrouvées au niveau de la villosité sauf les cellules de Paneth, qui elles, sont retrouvées dans la crypte (Haubrich et al., 1995; Brittan et Wright, 2002).

## 2- LE CYCLE CELLULAIRE

Le cycle cellulaire décrit les étapes conduisant à la duplication des cellules. Il est composé de 5 phases soit, G0, G1, S, G2 et M (Figure 3). La phase G0 est une phase de quiescence durant laquelle l'activité métabolique est faible et où les cellules exercent souvent une fonction différenciée. Une cellule quiescente (G0), stimulée par des agents mitogènes, peut entrer dans le cycle pour se diviser. Cette division commence par une entrée en phase G1. Pendant cette phase, la taille de la cellule augmente et la cellule augmente aussi la synthèse des protéines nécessaires à l'entrée en phase S. La phase S est la phase de synthèse d'ADN. À la fin de cette phase, une cellule initialement diploïde



**Figure 3**

**Les différentes phases du cycle cellulaire**

Le cycle cellulaire est divisé en 5 phases soit G0, G1, S, G2 et M. L'ensemble des phases G1, S et G2 constitue l'interphase. (Tiré et modifié de [www.hhmi.org/communic/annrep/research/regulate.htm](http://www.hhmi.org/communic/annrep/research/regulate.htm))



(2N) devient tétraploïde (4N). La phase G2 est la phase intermédiaire entre la synthèse d'ADN et la mitose. Cette phase prépare la cellule à la dernière phase, soit la phase M. Cette dernière correspond à la division de la cellule où la cellule mère va donner naissance à 2 cellules filles (Stevens et La Thangue, 2003).

La durée du cycle cellulaire varie d'un type cellulaire à un autre. Une levure peut se diviser toutes les 90-120 minutes dans des conditions idéales alors qu'une cellule de foie humain peut prendre un an avant de se diviser (Alberts et al., 1998). Cependant, chez une cellule de mammifère typique, le cycle cellulaire dure environ 24 heures soit 10 heures pour la phase G1, 6 heures pour la phase S, 4 heures pour la phase G2 et 2 heures pour la mitose (Suzuki et al., 1991).

L'ensemble des périodes G1, S et G2 constitue l'interphase, c'est-à-dire, le temps qui sépare les mitoses (Figure 3). La mitose, quant à elle, est subdivisée en plusieurs stades : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase, télophase et cytodierèse. La prophase est caractérisée par une condensation de la chromatine et la formation des chromatides sœurs. À la prométaphase, l'enveloppe nucléaire se fragmente et le nucléoplasme et le cytoplasme se confondent. L'apparition du fuseau nucléaire se fait à la métaphase. Les chromosomes migrent alors vers le plan équatorial de la cellule et s'attachent aux fibres du fuseau par leurs centromères. L'anaphase débute lorsque les chromatides sœurs se séparent, chacun migrant vers un pôle. Finalement, la télophase est caractérisée par la formation d'une nouvelle enveloppe nucléaire alors que la cytodierèse est caractérisée par la division du cytoplasme et la formation d'une nouvelle membrane cellulaire (Suzuki et al., 1991, Alberts et al., 1998).

La transition à travers les différentes phases du cycle cellulaire est finement contrôlée. Des points de contrôle (*check-points*), comme leur nom l'indique, contrôlent le

passage d'une phase du cycle à une autre. Ces points de contrôle se situent au niveau de la transitions des phases G1/S (point de restriction (R)), G2/M et à la métaphase en mitose. Le point de contrôle situé à la fin de la phase G1, permet à la cellule de vérifier si la duplication de son matériel protéique est terminée et si son environnement est favorable à sa division. Celui en phase G2/M permet à la cellule de s'arrêter avant d'entamer le processus de division cellulaire en vérifiant, entre autres, si la réplication de l'ADN est bien terminée et si l'ADN est complètement condensé. Finalement, le dernier point de contrôle permet à la cellule de s'assurer que les chromosomes sont bien alignés le long de la plaque équatoriale afin de favoriser une ségrégation équitable entre les deux cellules-filles (Alberts et al., 1998).

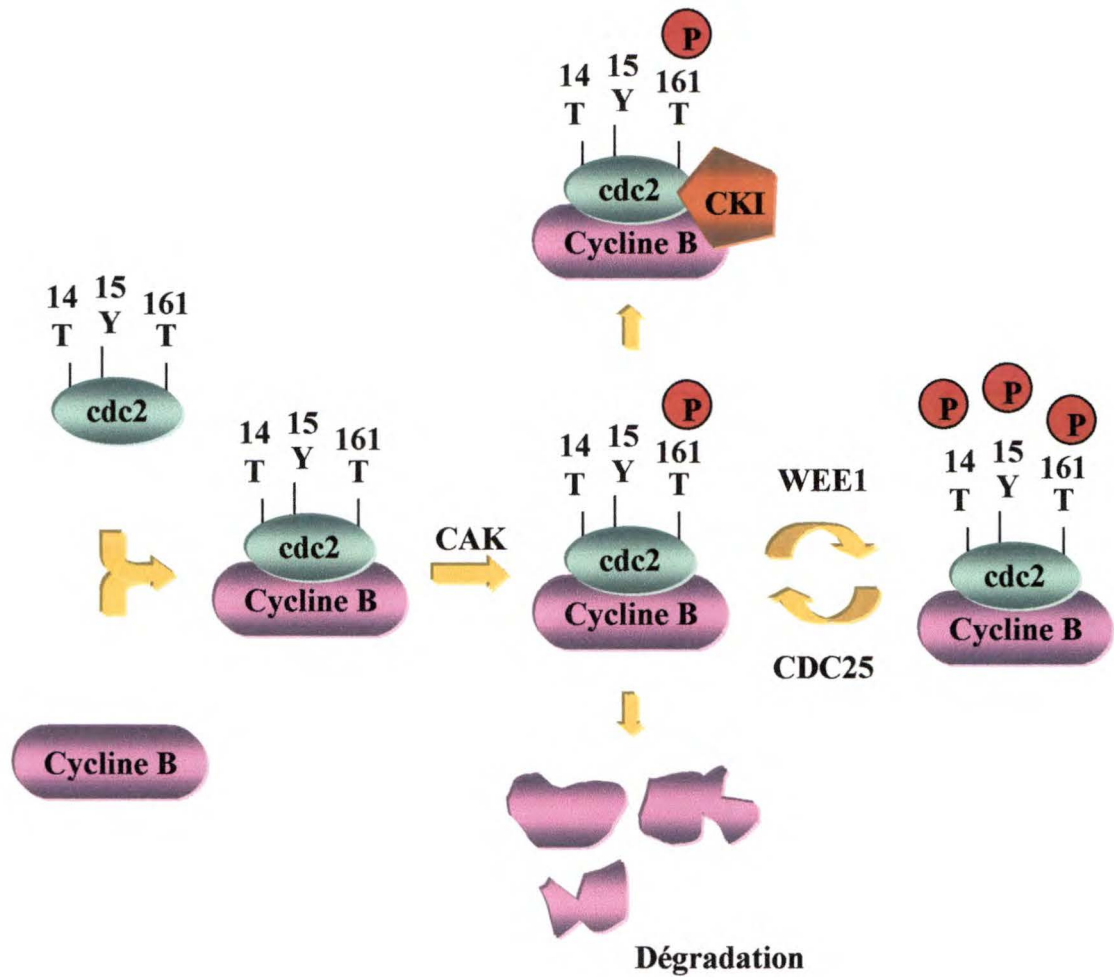
### *2.1 Les complexes cyclines/cdks*

La progression à travers les différentes phases du cycle est contrôlée par l'association entre deux familles de protéines : les cyclines et les cdks (cyclin-dependent kinase). La cycline représente la sous-unité régulatrice du complexe alors que la cdk est la sous-unité catalytique. Jusqu'à présent, 9 cyclines (A, B, C, D, E, G, H, K, T) et 9 cdks (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) ont été identifiées. La formation de différents complexes cyclines/cdks, spécifiques à chacune des phases, va permettre la progression du cycle cellulaire. Alors que le niveau d'expression des cdks reste relativement stable, celui des cyclines varie en fonction du cycle et ce, de façon différentielle.

Plusieurs complexes cyclines/cdks sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Les principaux sont les complexes cycline D/cdk4(6), cycline E/cdk2, cycline

A/cdk2 et cycline B/cdk1 (Figure 3). Le complexe cycline H/cdk7, appelé aussi CAK, est quant à lui, impliqué indirectement dans la progression du cycle. Il existe cependant d'autres complexes cyclines/cdks qui sont impliqués dans différents processus cellulaires comme les complexes cycline C/cdk8, cycline T/cdk9 et cycline H/cdk7 par exemple qui jouent un rôle dans les étapes d'initiation de l'élongation de l'ARNm lors de la transcription (De Luca et al., 2002).

Les deux premières cyclines à être induites en phase G1 sont les cyclines D et la cycline E. L'expression de la cycline D1 dépend largement des signaux extracellulaires et représente un lien fondamental entre les agents mitogènes, la signalisation intracellulaire et le cycle cellulaire. À l'inverse, l'expression des cyclines E, A et B est, de façon générale, indépendante des signaux extracellulaires. Les premiers complexes activés en réponse aux agents mitogènes sont donc les complexes cycline D/cdk4(6) et cycline E/cdk2. L'entrée en phase S est caractérisée par une augmentation de l'expression de la cycline A, ce qui permettra l'activation du complexe cycline A/cdk2. Finalement, en mitose il y aura augmentation de l'expression de la cycline B qui va ainsi s'associer à cdk1. Certaines cyclines sont cependant exprimées tout au long du cycle. C'est le cas de la cycline H qui, associée à cdk7, forme un complexe actif pendant toutes les phases du cycle.



**Figure 4**

**Mécanismes d'activation et d'inactivation des complexes cyclines/cdks**

Pour être active, une cdk doit préalablement d'associer à sa cycline. Le complexe doit ensuite être phosphorylé par la kinase CAK. L'inactivation du complexe cycline/cdk peut se faire de trois façons soit par la dégradation de la cycline, par l'association avec un inhibiteur du cycle cellulaire ou par phosphorylation sur des résidus thréonine et tyrosine.

### *2.1.1 Mécanismes d'activation des complexes cyclines/cdks*

Une cdk isolée est inactive. Son activation est liée à deux événements : 1- sa liaison avec une sous-unité régulatrice, la cycline et 2- une phosphorylation sur un résidu thréonine. L'association de la sous-unité régulatrice à la sous-unité catalytique est un élément important dans le processus d'activation du complexe cycline/cdk, mais il n'est pas le seul. Une fois le complexe formé, il doit subir une phosphorylation pour être complètement actif. Cette phosphorylation va se faire sur un résidu thréonine conservé autour de la position 160 par la kinase CAK (cycline H/cdk7) (Hunter et Pines, 1994). Une fois ces deux événements réalisés, le complexe cycline/cdk est maintenant actif (Figure 4).

### *2.1.2 Mécanismes d'inactivation des complexes cyclines/cdks*

L'inactivation des complexes cyclines/cdks une fois leurs fonctions réalisées est nécessaire à la progression du cycle. Plusieurs mécanismes peuvent inhiber l'activité de ces complexes. La dégradation des cyclines est un mécanisme très répandu et utilisé pour limiter les niveaux d'expression des cyclines et ainsi contrôler la prolifération cellulaire. Ainsi, la cycline D1 peut être phosphorylée par la glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) et être ainsi dégradée par la voie du protéasome (Diehl et al., 1997). Certaines cyclines possèdent aussi une séquence déstabilisante nommée PEST qui joue un rôle dans le contrôle de leur stabilité (Rogers et al., 1986).

Les complexes cyclines/cdks peuvent aussi être inhibés par phosphorylation. En effet, une kinase appelée WEE1 peut phosphoryler la cdk sur deux résidus soit la thréonine 15 et la tyrosine 14. Cette inhibition peut être temporaire puisque la réactivation du complexe peut se faire via une déphosphorylation par les phosphatases à double spécificité de la famille CDC25 (Nilsson and Hoffmann, 2000).

Le dernier mécanisme permettant l'inhibition des complexes cyclines/cdks se fait via des protéines inhibitrices qu'on appelle inhibiteurs du cycle cellulaire. Ces protéines ont la capacité de s'associer aux complexes cyclines/cdks et d'inhiber ainsi leur activité (Figure 4) (Sherr et Roberts, 1995; Sherr et Roberts, 1999).

## *2.2 Les inhibiteurs du cycle cellulaire*

La découverte de protéines capables d'inhiber l'activité kinase des complexes cyclines/cdks a permis d'identifier un nouveau mécanisme de contrôle de la prolifération cellulaire (Sherr et Roberts, 1995). Ces inhibiteurs peuvent induire un arrêt du cycle cellulaire en réponse à plusieurs signaux anti-mitogéniques. Ils sont divisés en deux familles : les Ink4 et les Cip/Kip. Malgré un mécanisme d'action différent dans l'inhibition de l'activité des complexes cyclines/cdks, une caractéristique commune à tous ces inhibiteurs est qu'ils peuvent induire un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire lorsqu'ils sont surexprimés (Sherr et Roberts, 1995; Sherr et Roberts, 1999).

### 2.2.1 La famille des Ink4

La famille des Ink4 comprend les membres  $p16^{\text{Ink4a}}$ ,  $p15^{\text{Ink4b}}$ ,  $p18^{\text{Ink4c}}$  et  $p19^{\text{Ink4d}}$ . Ces inhibiteurs abolissent, de façon spécifique, l'activité des complexes cycline D/ckd4 (Sherr et Roberts, 1995). Ces inhibiteurs possèdent quatre ou cinq motifs ankyrin (Serrano et al., 1993). Ces motifs permettent leur association avec cdk4 ou cdk6 et cette association empêche la liaison entre la cdk et la cycline D entraînant ainsi un arrêt du cycle cellulaire (Guan et al., 1994; Hannon et Beach, 1994; Chan et al., 1995; Hirai et al., 1995). De plus, en prévenant l'association des complexes cycline D/ckd4(6), les protéines de la famille Ink4 forcent la redistribution des inhibiteurs de la famille Cip/Kip vers les complexes cycline E/ckd2 qui inhibent ainsi l'activité de ces derniers.

L'inhibiteur  $p16^{\text{Ink4a}}$  a été le premier inhibiteur à être découvert. Il a d'abord été identifié comme étant une protéine capable de s'associer avec la sous-unité cdk4 et pouvant inhiber son activité (Xiong et al., 1993; Serrano et al., 1993). Parallèlement, d'autres groupes l'ont identifié comme étant un gène suppresseur de tumeur puisque le gène de  $p16^{\text{Ink4a}}$  est inactivé dans plusieurs types de cancers (Kamb et al., 1994; Nobori et al., 1994; Okamoto et al., 1994). La régulation de l'expression de  $p16^{\text{Ink4a}}$  se fait surtout au niveau transcriptionnel. L'ARNm de  $p16^{\text{Ink4a}}$  est très stable et la stabilité de l'ARNm et de la protéine suggère que le rôle biologique de  $p16^{\text{Ink4a}}$  n'est pas dans le contrôle de réponses à court terme (Serrano, 1997). En effet, l'expression de  $p16^{\text{Ink4a}}$  demeure constante tout au long du cycle cellulaire et pendant la transition quiescence-prolifération (Hara et al., 1996; Stone et al., 1996). L'accumulation de l'ARNm et de la protéine de  $p16^{\text{Ink4a}}$  est quand même observée dans certaines conditions comme la sénescence et en

réponse à certains stimuli oncogéniques (Hara et al., 1996; Zindy et al., 1997; Palmero et al., 1997; Alcorta et al., 1996; Serrano et al., 1997; Parry et al., 1995).

Peu de choses sont connues quant à la régulation de l'expression des autres inhibiteurs de la famille des Ink4. Dans les cellules épithéliales, le TGF $\beta$  induit l'expression de p15<sup>Ink4b</sup> (Hannon et Beach, 1994) alors que l'expression des inhibiteurs p18<sup>Ink4c</sup> et p19<sup>Ink4d</sup> est régulée de façon périodique pendant le cycle cellulaire avec un maximum d'expression en phase S (Hirai et al., 1995; Chan et al., 1995). Il semble cependant que l'expression de p18<sup>Ink4c</sup> peut être régulée par plusieurs facteurs de transcription comme E2F, Sp1 et PPAR $\gamma$  (Blais et al., 2002; Morrison et Farmer, 1999). De plus, l'expression de p18<sup>Ink4c</sup> est augmentée pendant la différenciation de certains types cellulaires comme les cellules musculaires (Franklin et Xiong, 1996). Ces différents patrons d'expressions ainsi que les différents mécanismes d'induction d'expression de ces inhibiteurs suggèrent qu'il existe peu de redondance entre les inhibiteurs de la famille des Ink4 (Serrano, 1997).

### *2.2.2 La famille des Cip/Kip*

La famille des Cip/Kip comprend les membres p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> et p57<sup>Kip2</sup>. Ces inhibiteurs ont un spectre d'activité plus large que les inhibiteurs de la famille des Ink4 puisqu'ils peuvent inhiber l'activité kinase de tous les complexes cyclines/cdks. Ils ont cependant une plus forte affinité pour les complexes cycline E/cdk2 (Harper et Elledge, 1996; Sherr, 1994; Toyoshima et Hunter, 1994). Leur mécanisme d'action est aussi différent. Les inhibiteurs de la famille Cip/Kip ont la capacité de s'associer au complexe



cycline/cdk déjà assemblé pour inhiber son activité. Deux membres de cette famille, les inhibiteurs  $p21^{Cip1}$  et  $p27^{Kip1}$ , ont cependant une autre activité qu'inhibiteur du cycle cellulaire. En effet, à de faibles concentrations, ils sont capables de promouvoir la progression à travers le cycle en favorisant l'assemblage des complexes cyclines/cdks (LaBaer et al., 1997).

L'inhibiteur  $p21^{Cip1}$  a été découvert de deux façons indépendantes. Par double-hybride,  $p21^{Cip1}$  a été identifiée comme étant une protéine pouvant s'associer aux cdks (Harper et al., 1993). Il a aussi été identifié de par l'induction de son expression par la protéine suppresseur de tumeur p53 en réponse à une lésion à l'ADN (El-Deiry et al., 1993).  $p21^{Cip1}$  ne semble cependant pas jouer un rôle important dans le processus de tumorigénèse puisque très peu de mutations ont été retrouvées dans son gène et que les souris  $p21^{-/-}$  ne développent pas de tumeurs (Deng et al., 1995; Brugarolas et al., 1995). L'expression de  $p21^{Cip1}$  peut aussi être induite lors de la différenciation de certains types cellulaires et lors de la sénescence (Atadja et al., 1995; Tahara et al., 1995; Gartel et al., 1996). Cependant, la présence de  $p21^{Cip1}$  peut aussi nuire au processus de différenciation de certains types cellulaires comme pour les kératinocytes (Di Cunto et al., 1998). Paradoxalement, l'expression de  $p21^{Cip1}$  est aussi induite lorsque des cellules quiescentes sont stimulées avec des agents mitogènes. En effet, il semble que  $p21^{Cip1}$  augmente l'affinité entre cdk4 et la cycline D1 et amène ce complexe au niveau du noyau (LaBaer et al., 1997). En fait, c'est sa concentration qui va déterminer s'il joue un rôle d'inhibiteur ou d'activateur. À faible concentration,  $p21^{Cip1}$  va favoriser l'assemblage des complexes alors qu'à forte concentration, il va plutôt inhiber l'activité de ces mêmes complexes (LaBaer et al., 1997).

En plus d'inhiber la prolifération en bloquant l'activité des complexes cyclines/cdks, p21<sup>Cip1</sup> peut aussi inhiber la prolifération par un autre mécanisme. Il a été effectivement démontré que cet inhibiteur peut se lier à PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et ainsi inhiber la réplication de l'ADN. L'association entre PCNA et p21<sup>Cip1</sup> empêche l'activation de l'ADN polymérase  $\delta$  (Flores-Rozas et al., 1994; Waga et al., 1994).

p27<sup>Kip1</sup> a aussi été identifié de par son association aux complexes cyclines/cdks, mais en réponse à des stimuli anti-prolifératifs comme le TGF $\beta$  (Hengst et al., 1994; Polyak et al., 1994). D'ailleurs p27<sup>Kip1</sup> est le seul inhibiteur qui est connu pour réguler le cycle en réponse aux stimuli de l'environnement cellulaire. Plusieurs autres stimuli induisant un arrêt de prolifération le font via l'induction de l'expression de p27<sup>Kip1</sup> comme de faibles concentrations en sérum (Coats et al., 1996), la confluence cellulaire (Nourse et al., 1994), de fortes concentrations intracellulaires d'AMPc dans les fibroblastes (Kato et al., 1994), l'INF- $\gamma$  chez les cellules épithéliales mammaires (Harvat et al., 1997), l'interféron- $\beta$  dans des cellules humaines gastriques (Kuniyasu et al., 1997) et l'IL-6 dans des cellules de mélanome (Kortylewski et al., 1999). L'augmentation de l'expression de p27<sup>Kip1</sup> induite par l'absence ou par de faibles concentrations en sérum est nécessaire à l'arrêt du cycle puisque l'abolition de son expression par un antisens empêche l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0 (Rivard et al., 1996). D'un autre côté, plusieurs facteurs de croissance favorisent une dégradation rapide de p27<sup>Kip1</sup> pour permettre une entrée dans le cycle. Une stimulation avec du sérum ou divers facteurs de croissance (PDGF, EGF, thrombine) amène une diminution de l'expression de p27<sup>Kip1</sup> dans des fibroblastes quiescents (Coats et al., 1996; Agrawal et al., 1996).

Contrairement à p21<sup>Cip1</sup>, l'expression et l'activité de p27<sup>Kip1</sup> peuvent être régulées à plusieurs niveaux. En effet, son expression est régulée tant au niveau transcriptionnel (Servant et al., 2000) qu'au niveau traductionnel (Agrawal et al., 1996; Hengst et Reed 1996; Millard et al., 1997). Il reste cependant que le mécanisme le plus commun pour l'inactivation de p27<sup>Kip1</sup> demeure la dégradation par la voie du protéasome (Pagano et al., 1995). En effet, le complexe cycline E/cdk2, peut phosphoryler p27<sup>Kip1</sup> sur la thréonine 187. Cette phosphorylation amène p27<sup>Kip1</sup> vers la voie d'ubiquitinylation et de dégradation par le protéasome (Vlach, et al., 1997; Sheaff, et al., 1997).

Cependant, tout comme p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> peut aussi inhiber la prolifération par un autre mécanisme que via son association aux complexes cyclines/cdks. En effet, p27<sup>Kip1</sup> peut empêcher les complexes d'être phosphorylés par la kinase activatrice CAK et ainsi empêcher leur activation (Mandal et al., 1998).

Le dernier des inhibiteurs découvert est p57<sup>Kip2</sup> et très peu de choses sont connues concernant sa régulation. Tout comme p21<sup>Cip1</sup> et p27<sup>Kip1</sup>, il inhibe l'activité des complexes cyclines/cdks, mais la distribution de son ARNm est plus restrictive que ces derniers suggérant que p57<sup>Kip2</sup> joue peut-être un rôle important dans le développement de certains tissus (Lee et al., 1995; Matsuoka et al., 1995; Yan et al., 1997; Zhang et al., 1997). Il joue cependant un rôle très important dans la différenciation des cellules musculaires (Reynaud et al., 1999; Reynaud et al., 2000).

### *2.3 Contrôle de la transition G1/S*

La transition de la phase G1 à la phase S est un élément très important dans la progression du cycle cellulaire. En effet, une fois le point de restriction passé, la progression à travers les autres phases du cycle va se faire de façon indépendante des facteurs de croissance. Une cellule devant cesser de proliférer, pour entamer un programme de différenciation par exemple, devra donc arrêter son cycle à un endroit bien précis : avant le point R en phase G1. Deux familles de protéines sont importantes dans le contrôle de la transition G1/S : les protéines de la famille Rb et les facteurs de transcription E2F.

#### *2.3.1 Les protéines de la famille Rb*

La protéine Rb a été la première protéine de cette famille à être identifiée puisque des mutations dans son gène amenaient le développement de tumeurs de la rétine, appelées rétinoblastomes (Friend et al., 1986; Lee et al., 1987). D'autres études ont par la suite démontré que des mutations dans le gène de Rb ou la dérégulation de la cascade Rb étaient fréquemment observées dans plusieurs autres types de cancers (Weinberg, 1991; Weinberg, 1995). Des études parallèles sur certaines oncoprotéines virales ont aussi permis de démontrer le rôle de pRb dans la prolifération cellulaire. En effet, l'expression de la protéine E1A de l'adénovirus, de l'antigène T de SV40 et de la protéine E7 du papillomavirus stimule la prolifération cellulaire. Ces protéines ont toutes la capacité de s'associer à pRb. Les régions permettant la liaison de ces protéines à pRb superposent les

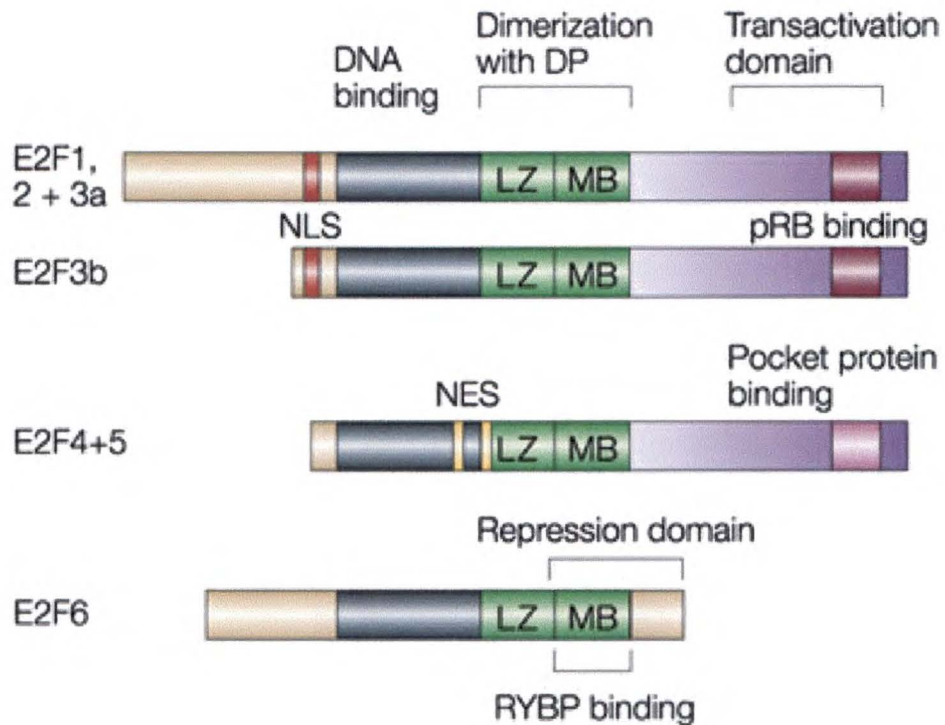
régions nécessaires à la transformation cellulaire (White et al., 1988; DeCaprio et al., 1988; Whyte et al., 1989; Dyson et al., 1989; Ewen et al., 1989; Munger et al., 1989). Ces résultats ont donc permis de démontrer le rôle central que joue pRb sur la régulation de la prolifération cellulaire. Depuis, deux autres protéines ont été identifiées de par leur homologie à pRb soit p107 et p130 (Ewen et al., 1991; Hannon et al., 1993; Li et al., 1993; Mayol et al., 1993). Ces trois protéines possèdent une forte homologie entre elles, surtout dans leur domaine C-terminal. Ce domaine est d'ailleurs le domaine qui médie l'interaction avec les oncoprotéines virales.

Les protéines de la famille Rb partagent plusieurs caractéristiques. Les patrons de phosphorylation de pRb et p107 en fonction du cycle cellulaire sont semblables i.e. qu'elles sont hypophosphorylées lorsque les cellules sont quiescentes et qu'elles sont hyperphosphorylées lorsque les cellules entrent en phase S. Cette phosphorylation est effectuée par les complexes cyclines/cdks de la phase G1. p130 est aussi phosphorylée par ces mêmes complexes cyclines/cdks lorsque les cellules sont stimulées à entrer dans le cycle. Cependant, contrairement à pRb et p107, p130 est aussi phosphorylée dans les cellules quiescentes. La ou les kinases responsable(s) de cette phosphorylation est (sont) inconnue(s), mais les cdks sont exclues (Baldi et al., 1995; Mayol et al., 1995; Mayol et al., 1996).

Une autre caractéristique commune à chacun des membres de cette famille est qu'ils ont la propriété de s'associer à plusieurs protéines comme les HDAC, les facteurs de transcription C/EBP et les cyclines D pour n'en nommer que quelques unes (Mulligan et Jacks, 1998). Cependant, les partenaires les plus connus sont les facteurs de transcription E2F. Les protéines de la famille Rb ont en effet la capacité de s'associer à ces protéines et d'inhiber leur activité transcriptionnelle (Zamanian et La Thangue., 1993;

Zhu et al., 1993; Schwarz et al., 1993; Vairo et al., 1995). Même si les mécanismes utilisés pour inhiber la transcription sont inconnus, des protéines comme les histones désacétylases (HDAC1) peuvent être associées aux protéines de la famille Rb pour moduler la transcription (Ferreira et al., 1998).

Malgré plusieurs similarités, plusieurs études démontrent aussi des rôles distincts pour p107 et p130 par rapport à pRb. L'expression de p130 est élevée dans les cellules quiescentes ainsi que dans les cellules différenciées et diminue quand des cellules quiescentes sont amenées à entrer dans le cycle cellulaire (Cobrinik et al., 1993; Smith et al., 1996). À l'inverse, les niveaux d'expression de p107 sont relativement faibles dans les cellules différenciées et augmente lorsque les cellules sont stimulées à proliférer. Les niveaux d'expression de pRb varient peu en fonction de la phase du cycle cellulaire (Classon et Dyson, 2001). Cependant, tout comme p130, l'expression de pRb peut être très élevée dans certains tissus différenciés (LeCouter et al., 1996). Une autre différence importante se situe au niveau de l'interaction des protéines de la famille Rb avec les facteurs de transcription E2F. Alors que pRb peut s'associer avec E2F1, E2F2, E2F3 et E2F4, p107 et p130 s'associent presque exclusivement à E2F4 et E2F5 (Classon et Dyson, 2001). Finalement, seuls p107 et p130 peuvent se lier avec les complexes cycline E/cdk2 et cycline A/cdk2 en phase S (Ewen et al., 1992; Faha et al., 1992; Lees et al., 1992). Le rôle de ces mégacomplexes est jusqu'à présent inconnu, mais il est suggéré que p107 et p130 pourraient jouer le rôle d'inhibiteurs de cdks en les séquestrant (Zhu et al., 1995).



**Figure 5**

**Représentation schématique des différents facteurs de transcription E2F**

Les facteurs de transcription E2F peuvent être divisés en 3 familles de par leur structure soit E2F1, E2F2 et E2F3 dans la première, E2F4 et E2F5 dans la deuxième et E2F6 dans la dernière. Tous les E2F possèdent une séquence de liaison à l'ADN ainsi qu'un domaine de liaison aux protéines DP. Sauf E2F6 qui possède un domaine de répression, tous les membres possèdent aussi un domaine de liaison aux protéines de la famille Rb ainsi qu'un domaine de transactivation. Seuls les membres de la première famille possèdent un signal de localisation nucléaire alors que seuls les membres de la deuxième famille possèdent un signal d'exportation nucléaire. (Tiré de [www.nature.com/nrm/journal/v3/n1/slideshow/nrm714\\_F2.html](http://www.nature.com/nrm/journal/v3/n1/slideshow/nrm714_F2.html))

### 2.3.2 Les facteurs de transcription E2F

Le facteur de transcription E2F1 a été la première protéine identifiée comme pouvant s'associer à pRb (Bagchi et al., 1991; Chittenden et al., 1991; Bandara et La Thangue, 1991; Helin et al., 1992; Kaelin et al., 1992). Les gènes cibles de ces facteurs de transcription sont principalement des protéines nécessaires à la prolifération et à la réplication de l'ADN comme le cycline E, l'ADN polymérase  $\alpha$ , la thymidine kinase ainsi que la dihydrofolate réductase (Dyson, 1998).

Dans les cellules, l'activité E2F vient d'un hétérodimère formé d'un facteur de transcription E2F et un co-facteur DP (Dyson, 1998). Chez les mammifères, 6 facteurs de transcription E2F ont été identifiés (E2F1 à E2F6) et il existe trois protéines DP soit DP-1, DP-2 et DP-3 (Figure 5). Toutes les combinaisons sont possibles ce qui augmente grandement la complexité de la régulation transcriptionnelle (Dyson, 1998). *In vitro*, tous les complexes E2F/DP reconnaissent des séquences d'ADN similaires malgré certaines différences (Lees et al., 1993; Tao et al., 1997). *In vivo*, il n'est cependant pas encore très clair s'il existe des séquences d'ADN spécifiques aux différents complexes E2F/DP (Stevens et La Thangue, 2003).

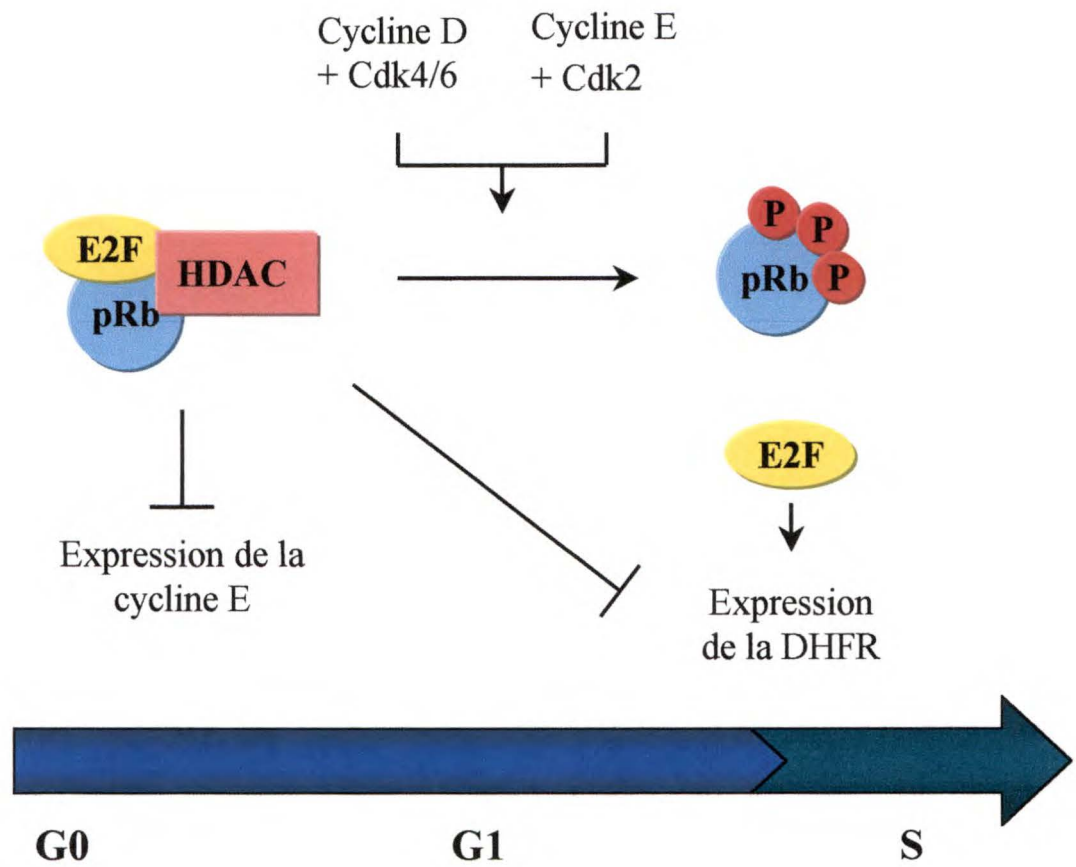
À cause de leur homologie, les facteurs de transcription E2F peuvent être divisés en trois sous-familles. L'une comprend E2F1, E2F2 et E2F3 alors qu'une autre est composée de E2F4 et E2F5. Il existe des similarités entre les membres de ces sous-familles. E2F1, E2F2 et E2F3 possèdent tous un domaine de liaison aux complexes cyclines/cdks et une séquence de localisation nucléaire (NLS). Ces deux domaines sont



absents chez E2F4 et E2F5. Ces deux derniers possèdent cependant une séquence d'exportation nucléaire (NES) (Gaubatz et al., 2001). La troisième sous-famille comprend E2F6 et ce membre jouerait plutôt un rôle répresseur de la transcription puisqu'il ne possède pas de domaine de transactivation (Morkel et al., 1997).

#### *2.3.2.1 Régulation de l'activité transcriptionnelle par les protéines de la famille Rb*

Le domaine de liaison des facteurs de transcription E2F à l'ADN superpose son domaine de liaison à pRb (Helin et al., 1992; Kaelin et al., 1992). La liaison de pRb à E2F inhibe donc la transactivation dépendante d'E2F (Helin et al., 1993; Flemington et al., 1993). Cette information, combinée au fait que la surexpression des E2F amènent les cellules quiescentes à entrer en phase S (Johnson et al., 1993) ont permis de mieux comprendre la régulation de la phase G1 et de postuler deux mécanismes de régulation de l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription E2F par les protéines de la famille Rb soit un modèle d'activation et un modèle de répression (Figure 6) (Müller et Helin, 2000). Dans le premier modèle, les gènes cibles de facteurs de transcription E2F sont activés à la fin de la phase G1 lorsque les complexes cyclines/cdks ont phosphorylé les protéines de la famille Rb et ainsi permis la libération d'hétérodimères E2F/DP. Ce modèle n'explique cependant pas pourquoi, dans certains cas, les protéines de la famille pRb et les facteurs de transcription E2F peuvent agir comme des répresseurs actifs de la transcription (Weintraub et al., 1995; Sellers et al., 1995; Luo et al., 1998; Magnaghi-Jaulin et al., 1998; Iavarone et Massagué, 1999). Un autre mode de régulation de la transcription a alors été postulé. Selon ce modèle, les facteurs de transcription E2F



**Figure 6**

**Modèle de la modulation de la transcription par pRb**

En phase G0 ainsi qu'en début de phase G1, pRb est associé aux facteurs de transcription E2F ainsi qu'à une HDAC. Ce complexe inhibe la transcription de gènes comme la cycline E. Lorsqu'il y a activation des complexes cyclines/cdks de la phase G1, il y a phosphorylation du complexe pRb/E2F/HDAC ce qui amène un relâchement de E2F qui peut ainsi activer ses gènes cibles et permettre l'entrée en phase S du cycle cellulaire. (Tiré et modifié de Adams, 2001)

répriment la transcription lorsqu'ils sont associés aux protéines de la famille Rb. C'est ce mécanisme qui est utilisé pour la régulation de l'expression de la cycline E (Zhang et al., 2000). Donc, dans les cellules quiescentes, les complexes E2F/pRb agissent comme répresseurs de la transcription alors que dans les cellules en phase S, les facteurs de transcription E2F activent la transcription de leurs gènes cibles (Müller et Helin, 2000).

#### *2.3.2.2 Autres mécanismes de contrôle de l'activité transcriptionnelle*

Plusieurs mécanismes, autres que leur liaison aux protéines de la famille Rb peuvent moduler l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription E2F. L'activité transcriptionnelle de ces protéines peut être modulée via la régulation de leur synthèse, la régulation de leur stabilité, l'état de phosphorylation, un changement de localisation cellulaire ainsi que par l'acétylation.

L'expression des facteurs de transcription E2F1, E2F2 et E2F3 est fortement régulée en fonction du cycle cellulaire. En effet, leur expression et leur activité atteignent un niveau maximal lorsque les cellules se retrouvent en phase G1/S. C'est donc dire que l'expression de certains facteurs de transcription E2F est faible dans les cellules quiescentes et/ou différenciées. L'activité transcriptionnelle va aussi dépendre de la stabilité de la protéine. Il a déjà été démontré que E2F1 et E2F4 peuvent être dégradés d'une manière dépendante de leur association avec les protéines de la famille Rb. La dégradation de E2F1 s'effectue de façon générale durant la transition S/G2 et la liaison de E2F1 à pRb protège E2F1 de la dégradation (Hofmann et al., 1996; Campanero et

Flemington, 1997; Marti et al., 1999). Le même phénomène est observé pour E2F4 où son association avec p107 ou p130 prévient sa dégradation (Hateboer et al., 1996). Un autre mécanisme qui peut moduler l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription E2F est la phosphorylation. Les E2F peuvent être phosphorylés par le complexe cycline A/cdk2 en phase S du cycle cellulaire. Cette phosphorylation a pour effet de diminuer l'affinité du complexe E2F/DP à l'ADN (Xu et al., 1994). E2F1 peut aussi être phosphorylé par la kinase Chk2 en réponse à un dommage à l'ADN. Cette phosphorylation a pour conséquence une augmentation de sa stabilité ainsi que de son activité transcriptionnelle (Stevens et al., 2003). Un changement de localisation cellulaire peut aussi moduler l'activité des E2F. Comme mentionné plus tôt, E2F4 et E2F5 ne possèdent pas de NLS. Ces protéines peuvent donc changer aisément de localisation cellulaire. Elles doivent cependant s'associer préalablement à une protéine possédant une séquence NLS pour transloquer au noyau. Dans plusieurs modèles cellulaires, E2F4 et E2F5 sont donc retrouvés au niveau du cytoplasme dans les cellules prolifératives et au niveau du noyau dans les cellules quiescentes (Stevens et La Thangue, 2003). Finalement, il a été démontré que E2F1 pouvait être acétylé et que cette acétylation avait pour effet d'augmenter sa liaison à l'ADN, son potentiel d'activation ainsi que sa demi-vie (Martinez-Balbas et al., 2000).

## *2.4 Régulation des protéines du cycle cellulaire par les voies de signalisation dans les cellules épithéliales intestinales*

Des études préliminaires au niveau de l'épithélium intestinal ont déjà démontré l'importance de l'inactivation des protéines de la famille pRb dans l'arrêt du cycle cellulaire nécessaire à la différenciation (Chandrasekaran et al., 1996). En effet, l'introduction de l'antigène T de SV40 dans les entérocytes est suivie d'une augmentation de l'expression de la cycline D1 ainsi que de cdk2. Plusieurs études ont par la suite tenté de déterminer les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression des protéines du cycle cellulaire dans les cellules intestinales.

L'implication de la PKC $\alpha$  dans l'arrêt du cycle cellulaire a été démontrée dans les cellules IEC-18. L'activation de cette sérine-thréonine kinase amène une diminution de l'expression des cyclines D et l'induction des inhibiteurs p21<sup>Cip1</sup> et p27<sup>Kip1</sup>. Ces modulations d'expression ont comme conséquence une altération dans l'expression et dans l'état de phosphorylation des protéines de la famille Rb (Frey et al., 2000). Un rôle pour les MAPK p42/p44 a aussi été démontré dans la régulation de l'expression de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> dans les cellules intestinales. En effet, l'activation des MAPK est nécessaire pour l'entrée en phase S du cycle cellulaire des cellules cryptales IEC-6 ainsi qu'à la diminution de l'expression de cet inhibiteur (Rivard et al., 1999). Finalement, la cascade Wnt/ $\beta$ -caténine joue aussi un rôle très important dans la progression du cycle cellulaire des cellules épithéliales intestinales. En effet, son activation amène une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans la progression du cycle

cellulaire comme la cycline D1 et c-myc (Tetsu et McCormick, 1999; Duchesne et al., 2003).

### 3- LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION C/EBP

Les C/EBP (CCAAT/enhancer-binding proteins) sont des facteurs de transcription impliqués dans plusieurs processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation et la réponse inflammatoire (Ramji et Foka, 2002). L'implication des C/EBP dans ces plusieurs processus est principalement causée par une expression différentielle des membres de cette famille selon l'état des cellules ainsi que le type cellulaire.

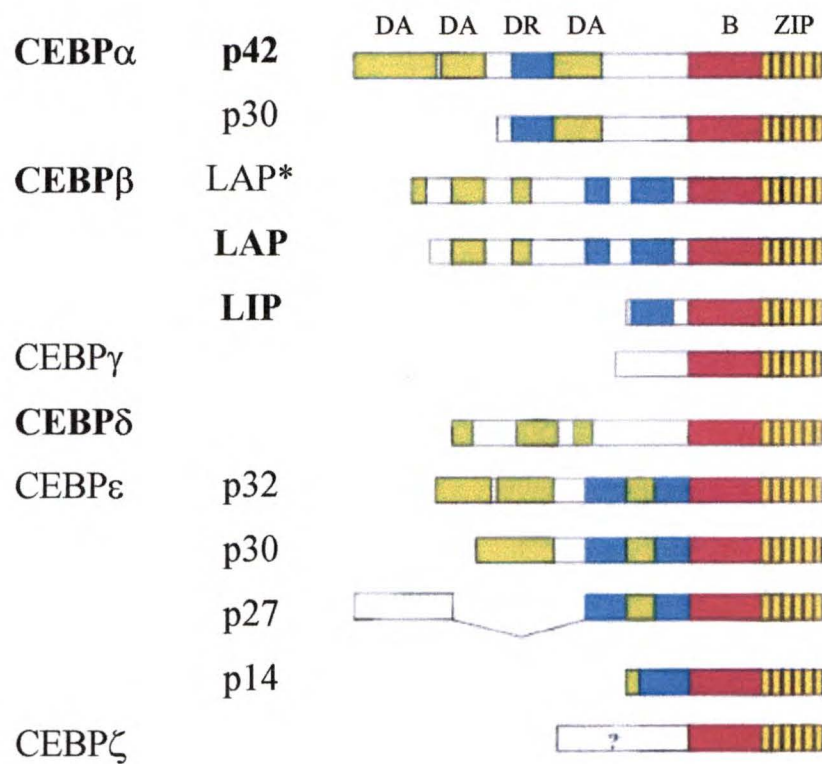
Six gènes pour six C/EBP différents ont été clonés: C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\gamma$ , C/EBP $\delta$ , C/EBP $\epsilon$  et C/EBP $\zeta$  (Figure 7) (Landshulz et al., 1988; Akira et al., 1990; Poli et al., 1990; Descombes et al., 1990; Chang et al., 1990; Roman et al., 1990; Cao et al., 1991; Williams et al., 1991; Ron et Habener, 1992). Un facteur de transcription C/EBP typique possède un domaine d'activation, un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de dimérisation. Tous les isoformes des C/EBP possèdent une très forte homologie (>90%) dans leur domaine C-terminal. Ce domaine comprend le domaine leucine zipper (bZIP) (Ramji et Foka, 2002). Ce dernier est important pour la dimérisation et la liaison à l'ADN de ces facteurs de transcription. En effet, la dimérisation de ces protéines est un élément essentiel pour leur liaison à l'ADN (Vinson et al., 1989; Hurst, 1995). À cause de la conservation du domaine bZIP, tous les isoformes des C/EBP peuvent former des hétérodimères entre eux (Ramji et Fako, 2002). Les C/EBP peuvent aussi former des interactions protéines-protéines avec d'autres facteurs de transcription possédant ou non

des domaines bZIP comme NF- $\kappa$ B et le complexe Fos/Jun (LeClair, et al., 1992; Vallejo et al., 1993; Hsu et al., 1994). Contrairement au domaine C-terminal très conservé, le domaine N-terminal des isoformes est très différents sauf pour 3 régions qui sont reconnues pour jouer un rôle important dans l'activation de la transcription parce qu'elles interagissent avec la machinerie transcriptionnelle de base.

Malgré l'existence de ces 6 gènes, un tissu peut exprimer un plus grand nombre d'isoformes de C/EBP à cause de 1- la présence de plusieurs codons d'initiation de la traduction sur un même ARNm pour C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  (Descombes et Schibler, 1991; Ossipow et al., 1993; Lin et al., 1993), 2- une protéolyse pour C/EBP $\beta$  (Welm et al., 1999) et 3- plusieurs promoteurs et un épissage alternatif pour C/EBP $\epsilon$  (Yamanaka et al., 1997).

C/EBP $\alpha$  a été le premier membre de la famille à être cloné. Il est exprimé majoritairement dans le foie, le tissu adipeux, l'intestin et les poumons (Birkenmeier et al., 1989; Antonson et Xanthopoulos, 1995). Deux isoformes de C/EBP $\alpha$  sont générés à partir du même ARNm soit un peptide de 42 kDa et un autre de 30 kDa. Ce dernier a cependant un pouvoir de transactivation plus faible comparé à l'isoforme de 42 kDa (Ossipow et al., 1993; Lin et al., 1993).

C/EBP $\beta$  a été identifié de par son implication dans la signalisation médiée par l'IL-6. Il est lui aussi exprimé majoritairement dans le foie, le tissu adipeux, l'intestin et les poumons (Cao et al., 1991). Tout comme pour C/EBP $\alpha$ , l'ARNm de C/EBP $\beta$  peut produire au moins trois isoformes appelés C/EBP $\beta$  pleine longueur (LAP\*), LAP et LIP de 38 kDa, 35 kDa et 20 kDa respectivement. Il semble cependant que l'isoforme LIP peut aussi être produit via une protéolyse (Welm et al., 1999). Des différences existent



**Figure 7**

**Représentation schématique des différents isoformes des C/EBP**

La région leucine zipper est représenté en jaune avec des barres noires alors que la région basique est en rouge. Les domaines d'activation (DA) sont en jaune et les domaines de régulation négative (DR) sont en bleu.



entre ces différents isoformes. En effet, LAP possède le domaine d'activation et le domaine bZIP alors que seul le domaine bZIP est retrouvé chez LIP. Ce dernier pourrait donc jouer un rôle de dominant négatif en formant des hétérodimères inactifs avec les autres membres des C/EBP (Descombes et Schibler, 1991).

C/EBP $\gamma$  est une petite protéine d'environ 16 kDa qui est exprimée de façon ubiquiste. Contrairement aux autres membres de la famille, elle ne possède pas de domaine de transactivation. Son association avec les autres membres de la famille des C/EBP inhibe donc la transcription en formant des hétérodimères inactifs (Cooper et al., 1995).

C/EBP $\epsilon$  peut former 4 isoformes de 32 kDa, 30 kDa, 27 kDa et 14 kDa (Yamanaka et al., 1997; Lekstrom-Himes, 2001). Son expression est très limitée et est surtout observée dans les cellules de myélocytes (Antonson et al., 1996; Morosetti et al., 1997). Les 4 isoformes de C/EBP $\epsilon$  possèdent tous des domaines d'activation différents ce qui leur confèrent des activités transcriptionnelles variées (Chumakov et al., 1997; Yamanaka et al., 1997).

Finalement, C/EBP $\zeta$  est exprimé de façon ubiquiste et son expression est principalement induite suite à un dommage à l'ADN (Fornace et al., 1989; Ron et Habener, 1992). Cet isoforme peut former des hétérodimères avec les autres C/EBP. Cependant, la présence de 2 prolines dans son domaine de liaison à l'ADN empêche le dimère de se lier à l'ADN (Ron et Habener, 1992). C/EBP $\zeta$  joue donc un rôle de dominant négatif en inhibant l'activité transcriptionnelle des autres C/EBP.

### *3.1 Rôle dans l'inflammation*

L'inflammation est une réaction de défense déclenchée par des cellules endommagées par des agents chimiques ou physiques ou par des microorganismes. L'inflammation conscrit les microbes, les toxines et les substances étrangères aux environs de la lésion et prépare le site pour la réparation tissulaire. L'inflammation est donc un processus permettant de rétablir l'homéostasie tissulaire. Quelques minutes après une blessure, la réponse inflammatoire débute avec l'activation et l'augmentation de la concentration de plusieurs substances pharmacologiques comme les protéines de la phase aiguë de la réponse inflammatoire dont font partie plusieurs cytokines (Benjamini et al., 1996; Tortora et Grabowski, 2001).

Parmi les différents gènes régulés par les facteurs de transcription C/EBP se retrouvent plusieurs protéines impliquées dans la réponse inflammatoire (Poli, 1998). L'activité et l'expression de plusieurs C/EBP ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$ ) sont modulées en réponse à plusieurs agents inflammatoires comme les lipopolysaccharides (LPS) et plusieurs cytokines comme l'IL-1 et l'IL-6 (Akira et al., 1990; Poli et al., 1990; Ramji et al., 1993; Poli, 1998; Alam et al., 1992). C/EBP $\beta$  a d'ailleurs été identifié comme un médiateur de la signalisation de l'IL-6 parce qu'il se liait au promoteur de plusieurs gènes impliqués dans la phase aiguë de la réponse inflammatoire comme le TNF, IL-8 et le G-CSF (Akira et al., 1992; Poli et al., 1990).

Les ARNm de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  sont fortement augmentés par des stimuli inflammatoires alors que celui de C/EBP $\alpha$  est plutôt diminué (Akira et Kishimoto, 1997; Alam et al., 1992). Chez les hépatocytes, l'inflammation amène un changement dans la

composition des hétérodimères de C/EBP. D'une majorité d'homodimères C/EBP $\alpha$  et d'hétérodimères C/EBP $\alpha$ /C/EBP $\beta$  dans les cellules normales, la réponse inflammatoire entraîne la formation d'hétérodimères composés majoritairement des isoformes  $\beta$  et  $\delta$  (Poli, 1998). Ce rôle dans l'inflammation n'est cependant pas spécifique aux hépatocytes. Dans plusieurs tissus, incluant l'intestin, une induction de l'expression de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  est observée suite à des stimuli inflammatoires. De plus, une expression différentielle des isoformes des C/EBP est observée pendant la différenciation des macrophages et des granulocytes. Ils modulent ainsi l'expression de plusieurs cytokines, mais aussi de protéines importantes dans la réalisation de leurs fonctions comme la mac-NOS (macrophage-inducible nitric oxide synthase) (Lowenstein et al, 1993), le lysozyme (Goethe et Loc, 1994) et la myeloperoxydase (Ford et al., 1996). Cependant, à cause de la grande quantité d'isoformes dans la même cellule, le rôle de chacun des C/EBP dans la régulation de ces gènes n'est pas très bien défini.

Dans la réponse inflammatoire, les facteurs de transcription C/EBP, notamment C/EBP $\beta$ , peuvent interagir avec d'autres facteurs de transcription. Le plus étudié est sans contredit NK- $\kappa$ B dont le rôle dans la réponse inflammatoire est bien connu (Stein et al., 1993; LeClair et al., 1992). Ce qui est intéressant c'est que plusieurs gènes de la réponse inflammatoire possèdent des éléments de réponse à C/EBP et à NF- $\kappa$ B dans leur promoteur. En fait, il existe une synergie entre ces deux facteurs de transcription dans l'induction de plusieurs gènes de réponse inflammatoire dont la protéine SAA, IL-6, IL-8 et IL-12 (Poli, 1998).

### *3.2 Rôle dans la prolifération cellulaire*

Les C/EBP sont aussi impliqués dans d'autres processus cellulaires comme la prolifération. Deux isoformes de C/EBP sont reconnus pour moduler la prolifération de plusieurs types cellulaires soit C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$ .

L'expression de C/EBP $\alpha$  est, de façon générale, limitée aux cellules non-prolifératives et différenciées dans les tissus où il est exprimé (McKnight, 2001) et chute dans les cellules prolifératives (Lekstrom-Himes et Xanthopoulos, 1998). D'ailleurs, la surexpression de cet isoforme inhibe la prolifération de plusieurs types cellulaires (Umek et al., 1991; Hendricks-Taylor et Darlington, 1995). Des études ont démontré que C/EBP $\alpha$  peut interagir avec plusieurs protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire dont l'inhibiteur p21<sup>Cip1</sup>. Chez les hépatocytes de souris, C/EBP $\alpha$  amène un arrêt de prolifération en causant une augmentation de l'expression de cet inhibiteur. Cette plus forte expression est causée par une augmentation de sa stabilité. En fait, p21<sup>Cip1</sup> peut s'associer à C/EBP $\alpha$  et cette association augmente la demie-vie de l'inhibiteur favorisant ainsi son accumulation (Timchenko et al., 1997). C/EBP $\alpha$  peut aussi moduler l'expression de p21<sup>Cip1</sup> au niveau transcriptionnel. Dans les cellules d'hépatomes de rat, l'augmentation de l'activité du promoteur de p21<sup>Cip1</sup> par les glucocorticoïdes est abolie en absence de C/EBP $\alpha$  (Cram et al., 1998). C/EBP $\alpha$  peut aussi interagir avec d'autres protéines du cycle cellulaire comme cdk2 et cdk4 et ainsi inhiber leur activité kinase (Wang et al., 2001). Il semblerait, pour cdk4, que son interaction avec C/EBP $\alpha$  amène sa dégradation par la voie du protéasome (Wang et al., 2002). C/EBP $\alpha$  peut aussi induire un arrêt du cycle cellulaire en formant un complexe avec les facteurs de transcription E2F.

Ces complexes se retrouvent sur des séquences consensus E2F et inhibent ainsi l'activité transcriptionnelle de ces derniers (Slomiany et al., 2000). Une association entre C/EBP $\alpha$  et E2F a d'ailleurs été démontré pendant l'adipogénèse (Porse et al., 2001). Finalement, C/EBP $\alpha$  peut aussi inhiber la prolifération en contrôlant la composition des complexes E2F via une interaction directe avec p107 pendant le développement du foie de souris. En effet, les complexes E2F/p107, caractéristiques de la phase S du cycle cellulaire, sont abolis en présence de C/EBP $\alpha$  à un stade précis du développement du foie (Timchenko et al., 1999).

D'un autre coté, C/EBP $\beta$  joue un rôle complètement opposé dans la prolifération cellulaire. Son expression est plus élevée dans plusieurs types de tumeurs (Greenbaum et al., 1998; Zhu et al., 2002; Buck et al., 1999; Buck et al., 2001). De plus, l'oncogène *ras* stimule l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$  (Zhu et al., 2002). La phosphorylation joue en effet un rôle important dans la modulation de son potentiel de transactivation. Il est fortement augmenté suite à une phosphorylation par des protéines souvent impliquées dans l'oncogénèse comme la cascade *ras*/MAPK (Zhu et al., 2002; Nakajima, et al., 1993), la PKC (Trautwein et al., 1993) et la Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent kinase (Wegner et al., 1992).

### *3.3 Implication dans le processus de différenciation adipocytaire*

En plus de jouer un rôle important dans la régulation de la prolifération cellulaire, plusieurs études démontrent le rôle important que jouent les C/EBP lors de la différenciation des préadipocytes en adipocytes. En effet, plusieurs analyses du

programme de différenciation des adipocytes montrent que les facteurs de transcription C/EBP et PPAR coopèrent dans l'induction de la différenciation de ces cellules. Les C/EBP semblent avoir différents rôles dans la régulation du processus de différenciation. En effet, après l'induction de la différenciation, une augmentation rapide de l'expression de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  est observée. Les préadipocytes effectuent ensuite environ deux cycles de division. La prolifération est rapidement inhibée suite à une augmentation de l'expression de C/EBP $\alpha$ . L'induction de C/EBP $\alpha$  est suivie de l'activation de protéines impliquées dans la création du phénotype adipocytaire comme GLUT4, SCD1 et la leptine (MacDougald et Lane, 1995). À la toute fin du processus de différenciation, une augmentation de l'expression de C/EBP $\zeta$  est observée.

L'activation différentielle des C/EBP et des marqueurs de différenciation laisse croire que l'induction de l'expression de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  amène une augmentation de l'expression de C/EBP $\alpha$ , qui à son tour, stimule le processus de différenciation. En effet, la surexpression de C/EBP $\beta$  ou C/EBP $\delta$  dans les préadipocytes accélère le temps d'induction de C/EBP $\alpha$  et du même coup l'adipogénèse (Yeh et al., 1995). De plus, les cellules déficientes en C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  sont incapables de se différencier (Tanaka et al., 1997). Il reste cependant qu'il existe un lien très important entre l'expression de C/EBP $\alpha$  et les marqueurs de différenciation. En effet, en absence de C/EBP $\alpha$ , aucun gène de différenciation n'est observé et il n'y a pas d'accumulation de triacylglycérol (Lin et Lane, 1992).

Les travaux effectués sur le rôle des C/EBP dans le processus de différenciation adipocytaire démontrent donc que C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  jouent un rôle important dans l'initiation du processus de différenciation, C/EBP $\alpha$  stimule la différenciation alors que,

dans des conditions non-favorables, C/EBP $\zeta$  inhibe le processus de différenciation (Darlington et al., 1998). Plusieurs travaux démontrent aussi un rôle des C/EBP dans le processus de différenciation de plusieurs autres types cellulaires dont les hépatocytes, les kératinocytes ainsi que les cellules intestinales (Ramji et Foka, 2002).

#### 4- OBJECTIFS

L'épithélium intestinal est un tissu en continuel renouvellement. Des études précédentes avaient permis de démontrer que les cellules de la crypte étaient des cellules prolifératives et que la séquestration des protéines de la famille Rb par l'Antigène T de SV40 dans les entérocytes amenait une rentrée dans le cycle cellulaire (Chandrasekaran et al., 1996). De plus, des études dans les cellules Caco-2 montraient que l'inhibition de l'activité de cdk2 et cdk4 corrélait avec l'arrêt de prolifération précédant l'induction de la différenciation entérocytaire (Ding et al., 1998). Cependant, il reste que peu de choses étaient connues quant aux mécanismes de contrôle de la prolifération et de la différenciation entérocytaire au niveau des protéines du cycle cellulaire.

L'objectif général de ce projet était donc de mieux comprendre les mécanismes de régulation des protéines du cycle cellulaire dans la prolifération, l'initiation et le maintien du phénotype intestinal différencié. Plusieurs modèles cellulaires ont été utilisés pour répondre aux différentes questions. Le modèle cellulaire Caco-2/15 provient d'un adénocarcinome de côlon et a très bien été caractérisé dans plusieurs études (Beaulieu et Quaroni, 1991; Vachon et Beaulieu, 1992; Vachon et Beaulieu, 1995). Ces cellules ont la

propriété de cesser de proliférer à l'atteinte de la confluence et d'entamer un programme de différenciation entérocytaire. Les cellules HIEC sont des cellules indifférenciées provenant de l'intestin fœtal humain. À l'atteinte de la confluence, ces cellules cessent toute prolifération, mais n'entament aucun processus de différenciation (Perreault et Beaulieu, 1996). Finalement, les PCDE sont des cultures primaires d'entérocytes différenciés non-prolifératifs provenant de l'intestin fœtal humain. En culture, ces cellules gardent les caractéristiques des cellules de la villosité (Perreault et Beaulieu, 1998). L'utilisation de ces cellules a permis de répondre aux trois objectifs spécifiques suivants :

- 1- L'étude de l'implication des inhibiteurs de la famille des Cip/Kip dans la différenciation des cellules intestinales humaines.
- 2- L'analyse du rôle des facteurs de transcription E2F et des protéines de la famille Rb lors de la prolifération et de la différenciation des cellules intestinales humaines.
- 3- Étude du rôle de différents isoformes de C/EBP ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$ ) sur l'inflammation et la prolifération des cellules intestinales.



## RÉSULTATS

### Article 1

**Deschênes, C., A. Vézina, J.-F. Beaulieu et N. Rivard** (2001) Role of p27<sup>Kip1</sup> in human intestinal cell differentiation. Gastroenterology 120: 423-438.

**Deschênes, C., Vézina, A., Beaulieu, J.-F., & Rivard, N. (2001). Role of p27<sup>Kip1</sup> in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology*, 120(2), 423-438.**  
**<https://doi.org/10.1053/gast.2001.21199>**

## **Article 2**

**Deschênes, C., L. Alvarez, M.-E. Lizotte. A. Vézina et N. Rivard.**

The nucleocytoplasmic shuttling of E2F4 is involved in the regulation of human intestinal epithelial cell proliferation and differentiation.

J. Cell. Physiol., sous-presse.

**Revised manuscript JCP-03-166**

**The Nucleocytoplasmic Shuttling of E2F4 Is Involved in the Regulation of  
Human Intestinal Epithelial Cell Proliferation and Differentiation.**

*Claude Deschênes<sup>1</sup>, Laetitia Alvarez<sup>1</sup>, Marie-Ève Lizotte<sup>1</sup>, Anne Vézina<sup>1</sup>,  
and Nathalie Rivard<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup> CIHR Group on Functional Development and Physiopathology of the Digestive Tract,  
Département d'Anatomie et Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine,  
Université de Sherbrooke, Sherbrooke (Québec), J1H 5N4, Canada.

*Short title: E2F and intestinal epithelial cell cycle*

**Keywords : E2F transcription factors, cell cycle, crypt epithelium, Rb proteins**

Total number of Figures : 6

Contract grant sponsor : Canadian Institutes of Health Research.

Contract grant number : MT-14405.

\* to whom correspondence should be sent:

Dr. Nathalie Rivard, Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire, Faculté de  
Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1H5N4, Canada.

Phone: (819) 564-5271

Fax : (819) 564-5320

e-mail: Nathalie.Rivard@USherbrooke.ca

**ABSTRACT**

The specific mechanisms controlling the transition from proliferation to terminal differentiation in human intestinal epithelial cells remain largely undefined. Herein, we analyzed the expression and localization of Rb and E2F proteins in well-established normal intestinal epithelial cell models which allow for the re-enactment of the crypt-villus axis *in vitro* as well as in intact epithelium and in colon cancer cells. We report that 1) expression of E2F1 is down-regulated while E2F4 protein is sequestered in the cytoplasm during G0 arrest associated with serum deprivation, confluency and terminal differentiation of intestinal cells; 2) concurrently, there is an accumulation of the hypophosphorylated form of the pocket proteins into the nucleus with an increased association of E2F4 with pRb and p130; 3) cells which expressed high levels of nuclear E2F4 are all positive for Ki67 staining in human fetal intestine; 4) activation of HIEC crypt cells by growth factors leads to an increase in the nuclear localization of E2F4 which may be attributable to a decrease in the serine/threonine phosphorylation of this transcription factor; 6) inhibition of p38 MAP Kinase with  $\alpha/\beta$  inhibitor SB203580 induces E2F4 translocation into the nucleus and its transcriptional activity. In conclusion, our data suggest a key role for E2F4 in proliferation of human intestinal crypt cells and that its cytoplasmic retention as well as its sequestration by Rb proteins may represent a critical step in initiating cell cycle exit.

## **INTRODUCTION**

Coordinated control of cell growth and differentiation is essential for normal tissue development; however, little is known regarding the underlying molecular mechanism involved in these processes (Zavitz and Zipurski, 1997). The epithelial lining of the human intestinal tract, which undergoes continuous and rapid renewal, provides a unique system in which the events involved in regulation of cell growth and differentiation can be studied. Proliferating, differentiating, and functional cells are all organized into well-defined regions in this polarized tissue, from which the entire sequence of developmental events is continuously on display at any moment in time (Stappenbeck et al., 1998; Karam, 1999). The decision to differentiate is abruptly taken by the committed crypt cells, whilst in their most rapid state of proliferation (Cairnie et al., 1965). These newly differentiated cells acquire their distinctive ultra structural features and cell surface markers upon leaving the proliferative cell cycle, at the top of the crypts or the base of the villus (Doell et al., 1965; Quaroni and Isselbacher, 1985; Karam, 1999).

Most cells withdraw from the cell cycle to differentiate during the G1 phase (Pardee, 1989; Zavitz and Zipurski, 1997). Hence, molecules that stimulate or inhibit G1-phase progression are considered to be propitious candidates for controlling cell cycle and cell differentiation in developing tissues. The Rb proteins are major regulators of cell proliferation and cell differentiation through their ability to suppress entry into the S-phase (Mulligan and Jacks, 1998). They perform this key activity by basically controlling the activity of the E2F family of transcription factors, which control gene expression following heterodimerization with DP proteins (Chellapan et al., 1991;

La Thangue, 1994). E2F proteins are divided into two classes based on structural and functional properties. The class consisting of E2F1, E2F2 and E2F3 is regulated almost exclusively by pRb, whereas E2F4 and E2F5 are regulated by p107 and p130 (Weinberg, 1996), although some instances of pRb/E2F4 complexes have been reported (Furukawa et al., 1999). E2F proteins have complex functions; they induce the transcription of genes that regulate S-phase entry, and concomitantly, their overexpression appears to be sufficient to promote transformation of certain immortalized cell lines (Jonhson et al., 1993; Beijersbergen et al., 1994; Singh et al., 1994; Xu et al., 1995). However, Rb-bound E2F may also repress gene transcription (Weintraub et al., 1992; Bremmer et al., 1995, Zacksenhaus et al., 1996). In addition, deregulated overexpression of E2F1 can trigger apoptosis in several cell types (Xu and Levine, 1994; Kowalik et al., 1995; Pierce et al., 1998; Pierce et al., 1999) and the onset of tumors in E2F1-deficient mice suggests that E2F proteins may also function as tumor-suppressor proteins (Field et al., 1996; Yamasaki et al., 1996). The significance of this inherent complexity of the E2F family is presently unclear.

Previous work has established that expression of SV40 large T antigen, which disrupts E2F-Rb complexes, leads to reentry of intestinal enterocytes into the cell cycle and intestinal hyperplasia, indicating a role of the Rb pathway in regulating intestinal homeostasis (Kim et al., 1994). Furthermore, studies by Ding et al. (2000) have demonstrated that Caco-2 differentiation is accompanied by changes in E2F/Rb protein complexes in which the number of E2F/p130 complexes is increased in terminally differentiated Caco-2 cells. Although we (Aliaga et al., 1999; Deschênes et al., 2001; Houde et al., 2001) and a number of investigators (Vachon and Beaulieu, 1995; Evers et

al., 1996; Ding et al., 1998; Tian and Quaroni, 1999) have used the Caco-2 cell line as a means to assess the potential mechanisms of enterocyte cell cycle arrest and differentiation, it must be remembered that this model is a transformed cell line and, hence, findings may not be entirely applicable in vivo. Therefore, in the present study, the regulation of Rb proteins (pRb, p107 and p130) and E2F family of transcription factors (E2F1 and E2F4) were analyzed for the first time in relation to normal human intestinal cell proliferation and differentiation in the intact epithelium as well as in well-established normal intestinal cell models allowing for the re-enactment of the crypt-villus axis in vitro : namely, normal crypt-like HIEC cells which are proliferative and undifferentiated (Perreault and Beaulieu, 1996; Deschênes et al., 2001), and PCDE cells which are primary cultures of differentiated and non-proliferative villus enterocytes (Perreault and Beaulieu, 1998; Deschênes et al., 2001). Our results suggest that nuclearly localized E2F4 may be critical for activating the necessary genes for S-phase entry and proliferation of intestinal epithelial crypt cells. We also propose that the shuttling of E2F4 and p130 between the nucleus and the cytoplasm may represent an additional mechanism for the regulation of E2F-dependent transcription in intestinal epithelial cells and thereby, for the regulation of their proliferation and differentiation.



## **MATERIALS AND METHODS**

***Materials and Antibodies*** : The p38 MAP Kinase inhibitor SB203580, the MEK1/2 inhibitor UO126, the PI-3K (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase) inhibitor LY294006, the PKA (Protein Kinase A) inhibitor H89, the GSK-3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ ) inhibitor LiCl and the Ca<sup>2+</sup>-dependent PKC (Protein Kinase C) inhibitor Gö6976 were purchased from Calbiochem-Novabiochem Corp. (San Diego, CA, USA). Antibodies against E2F1 (C-20), E2F4 (C-20), p107 (C-18), p130 (C-20) and C/EBP $\beta$  were all from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). Monoclonal antibody against pRb was from Pharmingen (Mississauga, ON, Canada). Antibody against Ki67 was from Chemicon (Temecula, CA, USA) and antibody against nucleolus antigen was from Calbiochem-Novabiochem Corp. Monoclonal antibody against phospho-serine/threonine residues was from Research Diagnostics Inc. (Flanders, NJ, USA). Monoclonal antibody HIS-14 against sucrase-isomaltase was kindly provided by Dr. A. Quaroni (Cornell University, USA). All other materials were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), unless stated otherwise.

***Specimens and Indirect Immunofluorescence*** : Tissues from fetuses varying in age from 18 to 20 weeks of gestation (postfertilization fetal ages were estimated according to Streeter (1920)) were obtained from normal elective pregnancy terminations. No tissue was collected from cases associated with a known fetal abnormality or fetal death. Studies were approved by our Institutional Human Subject Review Board. Segments of fetal small intestine were rinsed with 0.15 M NaCl, sectioned into small fragments, embedded in

optimum cutting temperature (OCT) compound, and quickly frozen in liquid nitrogen (Vachon and Beaulieu, 1995; Deschênes et al., 2001). Frozen sections 2- to 3-  $\mu\text{m}$  thick were spread on silane-coated glass slides and air-dried 1 h at room temperature before storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For indirect immunofluorescence, sections were fixed in 2% formaldehyde in PBS (pH 7.4 ; 45 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), followed by a 2-h incubation with appropriate primary antibody. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins from Boehringer Mannheim (Laval, QC, Canada) were used as secondary antibodies. Negative controls (no primary antibody) were included in all experiments.

**Cell Culture :** Non immortalized human intestinal epithelial cells (HIEC) were cultured as described previously (Perreault and Beaulieu, 1996) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 4 mM glutamine, 20 mM HEPES, 50 U/ml penicillin, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, 5 ng/ml recombinant human EGF (all obtained from Invitrogen), 0.2 IU/ml insulin (Connaught Novo Laboratories, Willowdale, ON, Canada), and 5% fetal calf serum (FCS). These undifferentiated intestinal epithelial cells block their proliferation upon reaching confluence but never initiate differentiation (Perreault and Beaulieu, 1996; Deschênes et al., 2001). Primary cultures of differentiated enterocytes (PCDE) prepared from specimens of human fetal small intestine ranging from 18 to 20 weeks of age were cultured as described above for HIEC. When tested after 5-7 days, these cultures of differentiated enterocytes remained well preserved, with both goblet and absorptive cells

exhibiting all of the main characteristics of intact villus intestinal cells (Perreault and Beaulieu, 1998).

***Immunofluorescence Microscopy on Cultured Cells.*** HIEC and PCDE cells grown on sterile glass coverslips were washed twice with ice-cold PBS. Cultures were then fixed in methanol-acetone (30%-70%) for 15 min at -20 °C, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min and blocked with PBS/BSA 2% (20 min at room temperature). Cells were immunostained following a 1-h incubation with primary antibody for 30 min with FITC-conjugated secondary antibody. Negative controls (no primary antibody) were included in all experiments.

***Protein Expression and Immunoblotting :*** Cells were lysed in SDS (sodium dodecyl sulfate) sample buffer (62.5 mM Tris-HCl {pH 6.8}, 2.3% SDS, 10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.005% bromophenol blue, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)). Proteins from whole cell lysates were separated by SDS-PAGE in 7.5% or 10% gels. Proteins were detected immunologically following electrotransfer onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences Corp., Baie d'Urfé, QC, Canada). Membranes were blocked for 1 h at 25°C in PBS containing 5% powdered milk in PBS and then incubated for 2-4 h at 25°C with primary antibodies in blocking solution and subsequently incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit (1:1000) IgG (both from Sigma-Aldrich) in blocking solution for 1 h. The blots were visualized by the Amersham ECL system. Protein concentrations were measured using a modified Lowry procedure with bovine serum albumin (BSA) as standard (Peterson, 1977).

***Co-immunoprecipitation Experiments*** : Cells were washed twice with ice-cold PBS and lysed in chilled lysis buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 40 mM Tris, pH 7.6, 1% Triton X-100, 0.1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 10 µg/ml aprotinin, 0.1 mM orthovanadate, and 40 mM β-glycerophosphate). Cell lysates were cleared of cellular debris by centrifugation. Primary antibodies were added to 800 µg of each cell lysate and incubated for 2 h at 4°C under agitation. Forty µg of protein A-Sepharose (Amersham Biosciences Corp.) were subsequently added for 1 h (4°C under agitation). Immunocomplexes were harvested by centrifugation and washed four times with ice-cold lysis buffer. Proteins were solubilized with Laemmli's buffer and separated by SDS-PAGE.

***Expression Vectors and Reporter Constructs*** : Plasmid DHFR-luciferase, which contains a high- affinity E2F binding site in the dihydrofolate reductase (dhfr) promoter (Slansky et al., 1993), was a kind gift of Dr. P. Farnham (University of Wisconsin, WI, USA). The expression vector (pCDNAneo3) for E2F4 was obtained from Dr C. Sardet (Sardet et al., 1995) (Institut de Génétique Moléculaire, Montpellier, France). The pRL-SV40 *Renilla* luciferase reporter vector was from Promega (Nepean, ON, Canada).

***Transient Transfections and Luciferase Assays***. Subconfluent HIEC were seeded in 6-well plates and co-transfected by lipofection (Lipofectamine 2000, Invitrogen) with 0.1 µg of DHFR-luciferase reporter, 0.25 µg of the relevant expression vector (pCDNAneo 3) containing E2F4 and 0.25 µg of the relevant expression vector containing DP-1. The

pRL-SV40 renilla luciferase vector (Promega) was used as a control for transfection efficiency. Two days after transfection, luciferase activity was measured according to the Promega protocol.

***Data Presentation and Statistical Analysis.*** Assays were performed in triplicate. Luciferase results were analyzed by the Student's *t* test and were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Typical Western blots and *in situ* indirect immunofluorescence shown are representative of 3 independent experiments.

## **RESULTS**

### ***Expression of Rb proteins and E2F transcription factors in normal human intestinal crypt and villus epithelial cells.***

Regulation of Rb proteins and E2F transcription factors in human intestinal epithelium was analyzed by verifying their expression in the crypt-like undifferentiated cells, HIEC, and PCDE, primary cultures of functional villus enterocytes. Cell lysates were prepared from both subconfluent asynchronously-growing and 5-day post-confluent HIEC and from PCDE. As illustrated in Fig. 1A, Rb proteins (pRb, p107 and p130) were easily detected in their hyperphosphorylated state in subconfluent HIEC but not much in confluent HIEC and in PCDE, indicating that most of these latter cells were arrested in G0/G1 phase. Indeed, the hyperphosphorylation state of pRb which persists until mitosis represents a marker of cell cycle progression and proliferation (La Thangue, 1994; Mulligan and Jacks, 1998). It is of note that the expression of p130 was remarkably enhanced in confluent HIEC and in PCDE. To explore the possibility that E2F transcription factors are differentially regulated or expressed in undifferentiated and differentiated intestinal epithelial cells, the expression of E2F1 (typified the E2F1-3 subfamily) and E2F4 (typified the E2F4-5 subfamily) was analyzed by Western blot. As shown in Fig. 1A, E2F1 expression was strongly down-regulated in confluent quiescent HIEC and PCDE compared to subconfluently growing HIEC. In contrast, levels of two E2F4 major bands were slightly increased by around 1.4-fold in confluent HIEC as well as in PCDE when compared to subconfluent HIEC. In concurrent control experiments, sucrase-isomaltase protein expression was exclusively found in PCDE and never in HIEC,

even after 5 days post-confluency. Equal protein loading of each lane was confirmed by anti-actin antibody labeling.

The potential association of Rb and E2F proteins in subconfluent proliferating and confluent quiescent HIEC crypt cells was verified by immunoprecipitation of E2F1 and E2F4 followed by Western blot analysis for Rb proteins. Unfortunately, E2F1 failed to immunoprecipitate from confluent HIEC cells probably because of sub-threshold expression levels in these cells (see Fig. 1A). Immunoprecipitated E2F4, on the other hand, was similar in all lanes (Fig. 1B). However, the amount of pRb and p130 immunoprecipitating with E2F4 was increased by respectively, 3.5-fold and 2-fold in quiescent confluent intestinal crypt cells suggesting that hypophosphorylated pRb and p130 did sequester E2F4 protein in these cells. p107 was not detected in E2F4 immunoprecipitates (data not shown).

#### ***Localization of E2F and Rb proteins in human intestinal epithelial cells.***

Localization of Rb and E2F proteins was analyzed in asynchronously-growing subconfluent HIEC cells (Fig. 2A), in quiescent confluent HIEC cells (data not shown) and in differentiated, non-proliferative villus enterocytes (PCDE) (Fig. 2B). Cells were first double-labeled with antibodies against E2F1 or E2F4 and the proliferation antigen Ki67 (MacCallum and Hall, 1999). As illustrated in Fig. 2A (panel 1), E2F1 was primarily nuclear in subconfluent HIEC cells, while still exhibiting very weak, albeit detectable cytoplasmic staining. Only a weak nuclear localization for E2F1 was seen in confluent HIEC cells (data not shown) and in differentiated enterocytes (PCDE) (Fig. 2B,

panel 3) confirming Western blot analysis (see Fig. 1A). In contrast, E2F4 showed little specificity for a given compartment in most subconfluent HIEC, being present in both the cytoplasm and in the nucleus (Fig. 2A, panel 5) except for some cells which were strongly positive for Ki67 staining (panel 6, see arrows), also expressed high levels of E2F4 in the nucleus (panel 5, see arrows). Interestingly, E2F4 staining was exclusively cytoplasmic in confluent quiescent HIEC (data not shown) and in non proliferative differentiated enterocytes (Fig. 2B, panel 7).

Subcellular compartmentalization of Rb proteins was also determined in human intestinal epithelial cells. Bright nuclear pRb staining was evident in asynchronously growing subconfluent HIEC cells (Fig. 2A, panel 9) and in differentiated enterocytes (PCDE) (Fig. 2B, panel 11). By contrast, p130 protein staining was predominantly cytoplasmic in subconfluent HIEC cells (Fig. 2A, panel 10). Cytoplasmic localization of p130 was completely altered in PCDE, as shown by nuclear translocation of p130 staining in differentiated enterocytes (Fig. 2B, panel 12). p107 staining was observed in the cytoplasm of all cell models: growing HIEC (Fig. 2A, panel 13) and differentiated PCDE cells (Fig. 2B, panel 15). Some p107 staining was also observed in the region of the nucleolus as confirmed by co-staining with an anti-human nucleolus which recognizes a specific nucleolar antigen found in human cells (Fig. 2A, panel 14, see arrows). Immunofluorescence experiments with the corresponding blocking peptide confirmed that these stainings were specific for p107 (Fig. 2B, panel 16).

***Differential expression of E2F1 and E2F4 in the human fetal intestinal epithelium.***



E2F1 and E2F4 were also further analyzed for their localization *in situ* in intact human fetal intestinal epithelium by immunofluorescence staining. E2F1 was mostly localized in the nuclei of cells present in the crypt and lower third of the villus with a progressive decrease in staining intensity towards the upper portions of the villus (Fig. 3A). Whereas E2F4 staining was generally weak in the nuclei and cytoplasm of the majority of crypt and villus cells (data not shown), strong staining was observed however in the nuclei of several crypt cells (Fig. 3B, see arrows). In order to determine whether these E2F4-expressing crypt cells were indeed proliferative cells, intestinal sections were double-labeled with antibodies to E2F4 and the proliferation antigen Ki67. As illustrated in Fig. 3C, cells which expressed high levels of E2F4 (arrows) were all positive for Ki67 staining (arrows). This correlation of high nuclear E2F4-expressing cells and Ki67 positive cells was consistently observed in human intestinal crypt epithelium (not shown).

***The abundance of E2F4 in the nucleus fluctuates in a cell cycle-dependent manner.***

Since E2F4 was observed in the nucleus of Ki67-positive cells, it was verified whether the nuclear abundance of E2F4 fluctuates in a cell cycle-dependent manner. The subcellular localization of E2F4 was therefore further analyzed in serum-deprived and serum-stimulated HIEC. Treatment of quiescent HIEC cells with serum growth factors stimulated S phase entry as monitored by Western blot analysis of pRb and Cdk2 phosphorylation (Fig. 4A). The appearance of a faster migrating species of Cdk2 is known to be indicative of phosphorylation of the enzyme on threonine 160 by Cdk-activating kinase (Gu et al., 1992). As illustrated in Fig. 4A, in serum-deprived HIEC cells, pRb was exclusively found in its hypophosphorylated, activated state. Inactivation

of pRb protein (hyperphosphorylated form) became apparent at 16h after serum stimulation, at the same time as the phosphorylation and activation of Cdk2. Fig. 4B (panel 1, see arrows) demonstrates that E2F4 was mostly detected in the cytoplasm of serum-starved cells arrested in G0, thus reflecting the same localization as that observed in terminally differentiated cells, irreversibly arrested in G0 (see PCDE cells in Fig. 2B, panel 7). However, E2F4 began to accumulate into the nucleus of a few cells after 3h of serum stimulation, and was primarily nuclear in almost all cells after 16h (data not shown) and 24h (Fig. 4B, panels 2-3, see arrows). In contrast, there was very little change in E2F1 compartmentalization, this factor residing primarily in the nucleus throughout the cell cycle (Fig. 4B, panels 4-6). These results indicate that serum growth factors promote nuclear translocation of E2F4 before S phase entry in HIEC cells.

***Decreased serine/threonine phosphorylation of E2F4 correlates with its nuclear localization.***

To get insight into how is regulated E2F4 localization, we performed E2F4 immunofluorescence experiments in serum-stimulated HIEC cells in presence or absence of phosphatase inhibitors. These were added during the last 3 h of serum treatment, in order to avoid toxic effects observed following long-term incubation. To address the potential role of protein tyrosine phosphatases in the control of E2F4 localization, subconfluent serum-stimulated HIEC cells were treated with vanadate, a potent inhibitor of tyrosine phosphatases (Gordon, 1991). As shown in Fig. 5A (panel 3), treatment of HIEC cells with vanadate had no effect on the nuclear localization of E2F4 induced by serum growth factors, indicating that tyrosine phosphatases are unlikely to play a major

role in the nuclear localization of E2F4. To further test the hypothesis that E2F4 localization might be regulated by serine-threonine phosphatases, HIEC cells were treated with microcystin-LR, a potent inhibitor of PP2A and PP1 (Honkanen et al., 1990). As seen in Fig. 5A (panel 4, see arrows), microcystin-LR treatment resulted in relocation of E2F4 to the cytoplasmic compartment in serum-stimulated HIEC cells. On the other hand, treatment of serum-stimulated HIEC cells with microcystin-LR did not affect the cytoplasmic re-distribution of p130 (data not shown, manuscript in preparation) as well as the nuclear localization of either E2F1 (Fig. 5A, panel 8) and C/EBP $\beta$  (data not shown) transcription factors. These experiments support the existence of a microcystin-LR-sensitive mechanism that regulates nuclear localization of E2F4 in cycling HIEC cells.

It has been reported that cell cycle withdrawal of adipogenic H1B1 cells is accompanied by a decrease in the DNA-binding and transcriptional activity of the E2F/DP complex, which was attributable to an increase in the phosphorylation of these proteins (Altioik et al., 1997). In light of the rapid redistribution of E2F4 from the nucleus to the cytoplasm following microcystin-LR treatment of serum-stimulated HIEC, possible modulation of E2F4 and DP phosphorylation by serum growth factors was tested in intestinal epithelial cells. As shown in Fig. 5B, treatment of HIEC with serum significantly decreased phosphorylation of E2F4 on serine and/or threonine residues hence showing a clear correlation between E2F4 serine/threonine phosphorylation and its cytoplasmic localization in intestinal crypt cells. In this regard, our Western blot analysis of E2F4 in intestinal quiescent cells consistently revealed a slower migrating form of E2F4 that was detected only in serum-deprived HIEC (not shown), in confluent HIEC and differentiated enterocytes (PCDE) (see Fig. 1A, fifth panel, lanes 2 and 3), suggesting that E2F4 might be phosphorylated in these cells. Taken together, our results suggest that

serine/threonine phosphorylation of E2F4 may be required for its cytoplasmic relocalization upon exit from the intestinal cell cycle.

***Inhibition of p38 MAP Kinase pathway is sufficient to trigger E2F4 into the nucleus.***

Increased serine/threonine phosphorylation of E2F4 correlates with its cytoplasmic localization in intestinal crypt cells suggesting that a serine/threonine kinase might be involved in the phosphorylation of E2F4 and thereby promotes its cytoplasmic localization in quiescent cells. It has been recently reported that activation of p38 MAP Kinase  $\alpha$  (Houde et al., 2001), PKA (Rhoads et al., 2000), PKC $\alpha$  (Frey et al., 2000) and GSK-3 $\beta$  (Wang et al., 2002) correlates with or induces cell cycle arrest in various intestinal cell lines. We therefore evaluated the impact of the inhibition of these kinases on the localization of E2F4 in serum-deprived quiescent HIEC cells. As seen in Fig. 6A (panels 1-4), treatment of serum-deprived HIEC cells with either the vehicle alone (DMSO) or with PKA (H89), PKC $\alpha$  (Gö6976) and GSK-3 $\beta$  (Lithium) inhibitors did not affect the cytoplasmic distribution of E2F4. However, treatment of serum-deprived HIEC with the p38 MAP Kinase  $\alpha/\beta$  inhibitor SB203580 did induce E2F4 translocation into the nucleus in around 30% of the cells after 16h (n=4) (Fig. 6A, panel 5, see arrows).

The effect of the p38 inhibitor on the subcellular localization of E2F4 prompted us to investigate whether p38 also affected the transcriptional activity of E2F4. The results shown in Fig. 6B demonstrate that ectopic expression of E2F4 stimulated *dhfr* gene expression by 5-fold in HIEC. Addition of SB203580 significantly enhanced the inducing effect of E2F4 on *dhfr* gene expression by 2.5-fold (Fig. 6B), indicating that p38

MAP Kinase  $\alpha/\beta$  may indeed negatively regulate E2F4 nuclear activity in intestinal crypt cells.

## **DISCUSSION**

E2F transcription factors regulate cell cycle progression by influencing the expression of proteins required for transition from G1 to S-phase and DNA synthesis (reviewed in Slansky and Farnham, 1996). A decrease in E2F activity is a prerequisite for induction of quiescence and terminal differentiation in many cell types (Chittenden et al., 1993; Jiang et al., 1995; Shin et al., 1995; Corbeil et al., 1995); moreover, the reactivation of DNA synthesis in quiescent cells by mitogens is accompanied by an increase in E2F-dependent transcription (Chittenden et al., 1993). Analysis of E2F4 and E2F1 expression in the intact intestinal epithelium and in cultured crypt cells herein suggests that nuclear E2F4 may be determinant in the promotion of G1/S phase transition of human intestinal epithelial crypt cells. Indeed, double staining experiments in vivo and in vitro revealed that crypt epithelial cells, which expressed high levels of nuclear E2F4, were all positive for Ki67. These observations are in agreement with Dagnilo et al. (1997), who recently demonstrated that E2F4 is highly and preferentially expressed in the proliferative zone of the murine embryonic intestine. Moreover, the recent generation of knock-out mice has revealed an important role for E2F4 in intestinal proliferation (Rempel et al., 2000). Indeed, in E2F4<sup>-/-</sup> mice, the number of crypt regions was reduced or completely absent and the villi were slimmer and shorter than in control mice suggesting that E2F4 plays a pivotal role in establishing and/or maintaining the intestinal crypt compartment (Rempel et al., 2000). It is noteworthy however, that E2F1 was well expressed and also localized in the nucleus of intestinal crypt cells suggesting that this factor may also drive expression of positive cell cycle regulatory factors in intestinal crypt cells. Indeed, both E2F1 and E2F4 were capable of driving expression of *dhfr* gene in HIEC crypt cells, in contrast to E2F5

which had no effect (data not shown). For E2F1, these data are consistent with its ability to promote cell cycle reentry of different cell types. It has also been reported that overexpression of E2F4 induces serum-starved rat embryo fibroblasts to enter the S phase but not as efficiently as overexpression of E2F1, E2F2 and E2F3 (Slansky and Farnham, 1996). However, E2F4 can also drive cell proliferation since E2F4/DP1 DNA binding complexes concur with the induction of *dhfr* gene expression during the transition of G1 to S in CHO 400 cells (Wells et al., 1997). Current experiments in our laboratory involve cDNA microarray analysis to characterize the genetic reprogramming that accompanies E2F1 and E2F4 overexpression in intestinal crypt cells.

Our results highlight three different mechanisms for inhibition of E2F activities during cell cycle exit and differentiation of human intestinal epithelial cells. The first mechanism involves the sequestration of E2F transcription factors by the pocket proteins pRb and p130, since an increased association of E2F4 with p130 and pRb was observed in quiescent intestinal epithelial cells. In this regard, Ding et al. (2000) recently reported that Caco-2 cell cycle arrest and differentiation are associated with the predominant formation of p130-E2F complexes. Accordingly, we found pRb and p130 proteins in the nucleus of quiescent intestinal epithelial cells. These observations are in agreement with those of Kiess et al. (1995), who have recently demonstrated that pRb and p130 are induced during myoblast differentiation and are detected in the nuclei of terminally differentiated myotubes. Thus, the presence of pRb and p130 in the nucleus of differentiated cells may be a key mechanism in maintaining growth arrest. The fact that viral oncoproteins, such as SV40 large T antigen, bind to the Rb family of proteins and lead to reentry of intestinal enterocytes into the cell cycle and intestinal hyperplasia (Kim

et al., 1994), is consistent with an important role for these proteins in the induction of cell cycle arrest and possibly in the differentiation process.

The second mechanism involves down-regulation of E2F expression. In effect, differential changes in the expression of E2F transcription factors following cell cycle exit and differentiation have been demonstrated in several cell types (Gill et al., 1994; Paramio et al., 2000). Our study demonstrates that although E2F4 was constitutively expressed throughout the cell cycle, even in quiescent differentiated cells, E2F1 expression was down-regulated in confluent HIEC and differentiated enterocytes. E2F1 has also been found to be down-regulated during neuronal (Persengiev et al., 1999) and myogenic (Puri et al., 1998) differentiation.

The third, and perhaps the most appealing mechanism, remains the demonstration that cellular localization of E2F4 is cell cycle-dependent. While E2F4 was found in the nucleus of proliferative intestinal cells, it was mostly distributed in the cytoplasm of quiescent intestinal crypt cells and differentiated enterocytes. These results contrast with that observed in Rat-1 fibroblasts where E2F4 is nuclear during G0 and shifts to the cytoplasm as cells pass into the S phase (Verona et al., 1997). Nevertheless, our results are in agreement with those of Gill and Hamel (2000), who recently reported that E2F4 is localized in the cytoplasm of quiescent Rat-1 and L6 myoblasts whereas serum stimulation induces a crossover to the nucleus. These authors also showed that E2F4 is sequestered in the cytoplasm during G0 arrest associated with terminal differentiation of the muscle. This suggests that cytoplasmic sequestration or nuclear export of E2F4 may provide a level of control of its transcriptional activity. In our



opinion, the most interesting and novel finding from the present study is that activation of HIEC crypt cells by growth factors leads to an increase in the nuclear localization of E2F4 which can be specifically reversed by the serine-threonine phosphatase inhibitor microcystin-LR. In addition, our immunoprecipitation experiments demonstrate that the nuclear localization of E2F4 correlates with a decrease in the serine/threonine phosphorylation of this transcription factor. Therefore, we put forward a hypothetical model of E2F4 phosphorylation-promoting its nuclear exit and/or its cytoplasmic localization. Whereas E2F1, E2F2 and E2F3 contain a nuclear localization signal (NLS), E2F4 and E2F5 do not (Puri et al., 1998). Hence, nuclear accumulation of E2F4 in some cells must be driven by association with a protein containing a NLS. Association with DP proteins has been shown to promote nuclear localization of E2F4 and E2F5 (Verona et al., 1997). One could therefore speculate that phosphorylation of E2F4 might result in its dissociation from DP proteins (or other NLS-containing proteins) eventually leading to the cytoplasmic accumulation of E2F4. However, at this point, further studies are required to clarify the mechanism by which the phosphorylation of E2F4 promotes its cytoplasmic localization. Interestingly, it has been reported that cell cycle withdrawal of adipogenic H1B1 cells is accompanied by a decrease in the DNA-binding and transcriptional activity of the E2F/DP complex, which was attributable to an increase in the phosphorylation of these proteins. This effect appears to be a consequence of decreased expression of the catalytic subunit of the serine-threonine phosphatase PP2A (Altiok et al., 1997). These authors suggested an important role for PP2A in the control of E2F/DP activity and a new mode of cell cycle control in differentiation. Herein, no modulation of PP2A expression has been observed in HIEC versus PCDE and in serum-stimulated HIEC cells (data not shown). This does not exclude however a possible modulation of PP2A (or other

phosphatases) catalytic activity upon growth factor stimulation. Conversely, one might speculate that a serine/threonine kinase was involved in E2F4 phosphorylation and therefore in its cytoplasmic localization in quiescent intestinal cells. Our results suggest that the p38 MAP Kinases  $\alpha/\beta$  isoforms are indeed very plausible candidates in this phosphorylation since their inhibition with the SB203580 inhibitor is sufficient to trigger E2F4 into the nucleus in absence of serum growth factors. Furthermore, we have previously demonstrated that kinase activity of p38 MAP Kinase  $\alpha$  was much more elevated in non proliferating intestinal epithelial cells as well as in differentiated enterocytes (Houde et al., 2001). p38 MAPK could be targeted to the transcription factor E2F4 by a docking domain which is distinct from the phosphoacceptor motifs. In fact, we have found a docking domain for p38 homologous to the general consensus sequence Arg/Lys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Leu/Ile-Xaa-Leu/Ile (Enslin et al., 2000) and localized between amino acids at positions 17-24 of E2F4 protein. However, further studies are needed to identify the phosphorylated serine/threonine residues on E2F4 and their roles in E2F4 function in intestinal epithelial cells and to clarify the mechanism by which p38 MAP Kinase inhibition specifically induces E2F4 transcriptional activity. It should be mentioned that Cyclin A/Cdk2 has previously been reported to phosphorylate and reduce the DNA-binding activity of E2F/DP complexes (Xu et al., 1994). However, we have recently shown that Cdk2 activity is negligible in confluent HIEC and differentiated enterocytes compared to that found in proliferating intestinal cells (Deschênes et al., 2001). Furthermore, because E2F4, unlike E2F1, E2F2, and E2F3, does not contain a cyclin-binding motif (Krek et al., 1995), it is tempting to speculate that other kinases may be involved in the phosphorylation of E2F4 in quiescent intestinal cells. Interestingly, E2F4

contains a unique serine repeat domain not found in other E2F family members. Although the function of this serine domain is unknown, it has been shown to be a target for mutation in replication error-positive colorectal cancers (Ikeda et al., 1998). Experiments aimed at analyzing the role of this serine repeat domain in the regulation of E2F4 compartmentalization in normal and tumoral intestinal cells are currently in progress.

Aside from demonstrations of a role of growth factors in the regulation of E2F4 nuclear localization, our study also provides evidence of nucleocytoplasmic trafficking of p130 depending on the growth state of the cells. Indeed, p130 (and not pRb and p107, data not shown) was mostly detected in the cytoplasm of asynchronously growing HIEC. Furthermore, p130 (and not pRb and p107) accumulates in the cytoplasm upon serum stimulation of HIEC cells (Deschênes and Rivard, manuscript in preparation). In contrast, p130 was exclusively nuclear in differentiated enterocytes. Hence, translocation of p130 into the nucleus during G0 could contribute to repression of E2F-dependent transcription, while shuttling out of the nucleus and into the cytoplasm as the cells enter the cell cycle would relieve repression. There are several reports demonstrating that p130 may be found in the cytoplasm in early S phase of the cell cycle (Cinti et al., 2000; Gill and Hamel, 2000; Chestukhin et al., 2002). Therefore, the dynamic regulation of E2F4 and p130 subcellular compartmentalization is clearly dependent on the state of the cells and the signals impinging on them, even in a quiescent non-cycling state.

In contrast to pRb and p130, p107 was found to be localized mainly in the cytoplasm and in the nucleolar region in crypt cells, and to a lesser extent in differentiated cells, suggesting a distinct role for this pocket protein in human intestinal epithelial cells.

However, this observation is not without precedent since Green et al. (2000) recently demonstrated that p107 was localized in the nucleolus in non-dividing human granulosa lutein cells. Their study suggests that p107 could play a specific role in the nucleolus during terminal differentiation of these cells and may involve repressing 28S, 18S and 5/8S rRNA genes. The role of p107 in the nucleolus of intestinal epithelial cells needs to be investigated.

In summary, our data demonstrate that nuclear E2F4 may be determinant in the promotion of G1-S phase transition in human normal intestinal epithelial crypt cells and that regulation of their subcellular compartmentalization may be required to maintain nuclei in a quiescent state in terminally differentiated cells. In this regard, the shuttling of E2F4 and p130 between the nucleus and the cytoplasm may represent an additional mechanism for the regulation of E2F-dependent transcription in intestinal epithelial cells and thereby, for the regulation of their proliferation and differentiation.

**Acknowledgements :** We thank P. Pothier for the critical reading of the manuscript. We wish to thank Drs C. Poulin and F. Jacot, obstetricians from the Département de la Santé Communautaire du Centre Universitaire de Santé de l'Estrie, for excellent collaboration in providing tissue specimens used in this study. This research was supported by grants from Canadian Institutes of Health Research (MT-14405 and GR-15186). Nathalie Rivard has a Canadian Research Chair in Signaling and Physiopathology. Claude Deschênes is a student scholar from Natural Sciences and Engineering Council of Canada.

## **REFERENCES**

Aliaga JC, Deschênes C, Beaulieu JF, Calvo EL, Rivard N. 1999. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am J Physiol* 277:G631-G641.

Altiock S, Xu M, Spiegelman BM. 1997. PPAR $\gamma$  induces cell cycle withdrawal : inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev* 11:1987-1998.

Beijersbergen RL, Kerkhoven RM, Zhu L, Carlee L, Voorhoeve PM, Bernards R. 1994. E2F-4, a new member of the E2F gene family, has oncogenic activity and associates with p107 in vivo. *Genes Dev* 8(22):2680-2690.

Bremner R, Cohen BL, Sopta M, Hamel PA, Ingles CJ, Gallie BL, Phillips RA. 1995. Direct transcriptional repression by pRB and its reversal by specific cyclins. *Mol Cell Biol* 15(6):3256-3265.

Cairnie, AB, Lamerton, LF, Steel GG. 1965. Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. II. Theoretical aspects. *Exp Cell Res* 39(2):539-553.

Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. 1991. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65:1053-1061.

Chestukhin A, Litovchick L, Rudich K, De Caprio JA. 2002. Nucleocytoplasmic shuttling of p130/RBL2 : novel regulatory mechanism. *Mol Cell Biol* 22:453-468.

Chittenden T, Livingston DM, De Caprio JA. 1993. Cell cycle analysis of E2F in primary T cells reveals novel E2F complexes and biochemically distinct forms of free E2F. *Mol Cell Biol* 13:3975-3983.

Cinti C, Claudio PP, Howard CM, Neri LM, Fu Y, Leoncini L, Tosi GM, Maraldi NM, Giordano A. 2000. Genetic alterations disrupting the nuclear localization of the retinoblastoma-related gene RB2/p130 in human tumor cell lines and primary tumors. *Cancer Res* 60:383-389.

Corbeil HB, Whyte P, Branton PE. 1995. Characterization of transcription factor E2F complexes during muscle and neuronal differentiation. *Oncogene* 11:909-920.

Dagnilo L, Fry CJ, Bartley SM, Farnham P, Gallie BL, Phillips RA. 1997. Expression patterns of the E2F family of transcription factors during murine epithelial development. *Cell Growth Differ* 8:553-563.

Deschênes C, Vézina A, Beaulieu JF, Rivard N. 2001. Role of p27<sup>Kip1</sup> in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* 120:423-438.

Ding, Q, Ko TC, Evers BM. 1998. Caco-2 intestinal cell differentiation is associated with G1 arrest and suppression of CDK2 and CDK4. *Am J Physiol* 275:C1193-C1200.

Ding Q, Wang Q, Dong Z, Evers BM. 2000. Characterization and regulation of E2F activity during Caco-2 cell differentiation. *Am J Physiol* 278:C110-C117.

Doell RG, Rosen G, Kretchmer N. 1965. Immunochemical studies of intestinal disaccharidases during normal and precocious development. *Proc Natl Acad Sci USA* 54:1268-1273.

Enslen H, Branchio DM, Davis RJ. 2000. Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *Embo J* 19: 1301-1311.

Evers BM, Ko TC, Li J, Thompson EA. 1996. Cell cycle protein suppression and p21 induction in differentiating Caco-2 cells. *Am J Physiol* 271:G722-G727.

Field SJ, Tsai FY, Kuo F, Zubiaga AM, Kaelin WG Jr, Livingston DM, Orkin SH, Greenberg ME. 1996. E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* 85(4):549-561.

Frey MR, Clark JA, Leontieva O, Uronis JM, Black AR, Black JD. 2000. Protein kinase C signaling mediates a program of cell cycle withdrawal in the intestinal epithelium. *J Cell Biol* 151:763-778.



Furukawa Y, Iwase S, Kikuchi J, Nakamura M, Yamada H, Matsuda M. 1999. Transcriptional repression of the E2F-1 gene by interferon-alpha is mediated through induction of E2F-4/pRB and E2F-4/p130 complexes. *Oncogene* 18(11):2003-2014.

Gill RM, Hamel PA. 2000. Subcellular compartmentalization of E2F family members is required for maintenance of the postmitotic state in terminally differentiated muscle. *J Cell Biol* 148:1187-1201.

Gill RM, Hamel PA, Zhe J, Zacksenhaus E, Gallie BL, Phillips RA. 1994. Characterization of the human RB1 promoter and of elements involved in transcriptional regulation. *Cell Growth Differ* 5:467-474.

Gordon JA. 1991. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol* 201: 477-482.

Green C, Chatterjee R, McGarridge HHG, Ahmed F, Thomas NSB. 2000. p107 is active in the nucleolus in non-dividing human granulosa lutein cells. *J Mol Endocrinol* 25:275-286.

Gu Y, Rosenblatt J, Morgan DO. 1992. Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *EMBO J* 11:3995-4005.

Honkanen RE, Zwiller J, Moore RE, Daily SL, Khatra BS, Dukelow M, Boynton AL. 1990. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J Biol Chem* 265(32):19401-19404.

Houde M, Laprise P, Jean D, Blais M, Asselin C, Rivard N. 2001. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J Biol Chem* 276(24):21885-21894.

Ikeda M, Orimo H, Moriyama H, Nakajima E, Matsubara N, Mibu R, Tanaka N, Shimada T, Kimura A, Shimizu K. 1998. Close correlation between mutations of E2F4 and hMSH3 genes in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 58 :594-598.

Jiang H, Lin J, Young SM, Goldstein NI, Waxman S, Davila V, Chelappan SP, Fisher PB. 1995. Cell cycle gene expression and E2F transcription factor in human melanoma cells induced to terminally differentiate. *Oncogene* 11:1179-1189.

Johnson DG, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR. 1993. Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* 365 :349-352.

Karam SM. 1999. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci* 4:D286-298.

Kiess M, Gill RM, Hamel PA. 1995. Expression and activity of the retinoblastoma protein (pRb)-family proteins, p107 and p130, during L6 myoblast differentiation. *Cell Growth Differ* 6:1287-1298.

Kim SH, Roth KA, Coopersmith CM, Pipas JM, Gordon JI. 1994. Expression of wild-type and mutant simian virus 40 large tumor antigen in villus-associated enterocytes of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6914-6918.

Kowalik TF, DeGregori J, Schwarz JK, Nevins JR. 1995. E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis. *J Virol* 69(4):2491-2500.

Krek W, Xu G, Livingston DM. 1995. Cyclin A-kinase regulation of E2F1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint. *Cell* 83:1149-1158.

La Thangue NB. 1994. DP and E2F proteins: components of a heterotrimeric transcription factor implicated in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 6:443-450.

MacCallum DE, Hall PA. 1999. Biochemical characterization of pKi67 with the identification of a mitotic-specific form associated with hyperphosphorylation and altered DNA binding. *Exp Cell Res* 10:186-198.

Mulligan G, Jacks T. 1998. The retinoblastoma gene family : cousins with overlapping interests. *Trends Genet* 14:223-229.

- Paramio JM, Segrelles C, Casanova ML, Jorcano JL. 2000. Opposite functions for E2F1 and E2F4 in human epidermal keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 275:41219-41226.
- Pardee AB. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246:603-608.
- Perreault N, Beaulieu JF. 1996. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res* 224:354-364.
- Perreault N, Beaulieu JF. 1998. Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Exp. Cell Res* 245: 34-42.
- Persengiev SP, Kondova II, Kilpatrick DL. 1999. E2F4 actively promotes the initiation and maintenance of nerve growth factor-induced cell differentiation. *Mol Cell Biol* 19:6048-6056.
- Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346-356.
- Pierce AM, Gimenez-Conti IB, Schneider-Broussard R, Martinez LA, Conti CJ, Johnson DG. 1998. Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(15):8858-8863.

Pierce AM, Schneider-Broussard R, Gimenez-Conti IB, Russell JL, Conti CJ, Johnson DG. 1999. E2F1 has both oncogenic and tumor-suppressive properties in a transgenic model. *Mol Cell Biol* 19(9):6408-6414.

Puri PL, Cimino L, Fulco M, Zimmerman C, LaThangue N, Giordano A, Graessmann A, Levrero M. 1998. Regulation of E2F4 mitogenic activity during terminal differentiation by its heterodimerization partners for nuclear translocation. *Cancer Res* 58:1325-1331.

Quaroni A, Isselbacher KJ. 1985. Study of intestinal cell differentiation with monoclonal antibodies to intestinal cell surface components. *Dev Biol* 111(2):267-279.

Rempel RE, Saenz-Robles MT, Storms R, Morham S, Ishida S, Engel A, Jakoi L, Melhem MF, Pipas JM, Smith C, Nevins JR. 2000. Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages. *Mol Cell* 6:293-306.

Rhoads JM, Argenzio RA, Chen W, Graves LM, Licato LL, Blikslager AT, Smith J, Gatzky J, Brenner DA. 2000. Glutamine metabolism stimulates intestinal cell MAPKs by a cAMP-inhibitable, Raf-independent mechanism. *Gastroenterology* 118:90-100.

Sardet, C, Vidal M, Cobrinik D, Geng Y, Onufryk C, Chen A, Weinberg RA. 1995. E2F-4 and E2F-5, two members of the E2F family, are expressed in the early phases of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2403-2407.

Shin EK, Shin A, Paulding C, Schaffhausen B, Yee AS. 1995. Multiple changes in E2F function occur upon muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 15:2252-2262.

Singh P, Wong SH, Hong W. 1994. Overexpression of E2F-1 in rat embryo fibroblasts leads to neoplastic transformation. *EMBO J* 13(14):3329-3338.

Slansky JE, Farnham PJ. 1996. Introduction to the E2F family : protein structure and gene regulation. *Curr Topic Microbiol Immunol* 208:1-30.

Slansky JE, Li Y, Kaelin WG, Farnham PG. 1993. A protein synthesis-dependent increase in E2F1 mRNA correlates with growth regulation of the dihydrofolate reductase promoter. *Mol Cell Biol* 13:1610-1618.

Stappenbeck TS, Wong MH, Saam JR, Mysorekar IU, Gordon JI. 1998. Notes from some crypt watchers : regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 10:702-709.

Streeter GL. 1920. Weight, sitting head, head size, foot length, and menstrual age of the human embryo. *Contr Embryol* 11:143-179.

Tian JQ, Quaroni A. 1999. Involvement of p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) in intestinal epithelial cell differentiation. *Am J Physiol* 276:C1245-C1258.

Vachon PH, Beaulieu JF. 1995. Extracellular heterotrimeric laminin promotes differentiation in human enterocytes. *Am J Physiol* 268:G857-G867.

Verona R, Moberg K, Estes S, Starz M, Vernon JP, Lees JA. 1997. E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. *Mol Cell Biol* 17:7268-7282.

Wang Q, Wang X, Hernandez A, Hellmich MR, Gatalica Z, Evers BM. 2002. Regulation of TRAIL expression by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3 pathway in human colon cancer cells. *J Biol Chem* 277:36602-36610.

Weinberg RA. 1996. E2F and cell proliferation: a world turned upside down. *Cell* 85(4):457-459.

Weintraub SJ, Prater CA, Dean DC. 1992. Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* 358(6383):259-261.

Wells JM, Illenye S, Magae J, Wu C, Heintz N. 1997. Accumulation of E2F4/DP1 DNA binding complexes correlates with induction of *dhfr* gene expression during the G1 to S phase transition. *J Biol Chem* 272:4483-4492.

Xu X, Levine AJ. 1994. p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(9):3602-3606.

Xu G, Livingston DM, Krek W. 1995. Multiple members of the E2F transcription factor family are the products of oncogenes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(5):1357-1361.

Xu M, Sheppard KA, Peng CY, Yee AS, Piwnica-Worms H. 1994. Cyclin A/cdk2 binds directly to E2F1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F1/DP1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 14:8420-8431.

Yamasaki L, Jacks T, Bronson R, Goillot E, Harlow E, Dyson NJ. 1996. Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* 85(4):537-548.

Zacksenhaus E, Jiang Z, Phillips RA, Gallie BL. 1996. Dual mechanisms of repression of E2F1 activity by the retinoblastoma gene product. *EMBO J* 15(21):5917-5927.

Zavitz KH, Zipurski SL. 1997. Controlling cell proliferation in differentiating tissues : genetic analysis of negative regulators of G1-S phase progression. *Curr Opin Cell Biol* 9:773-781.



## **FIGURES**

**Fig. 1. Expression of Rb proteins and E2F transcription factors in normal intestinal crypt and villus epithelial cells.** A. Cell lysates were prepared from subconfluent (-2 days : 70% of confluence) and 5-day post-confluent HIEC cells and from PCDE. Cell extracts (60 µg) were separated by 7.5% (for pRb, p107 and p130) or 10% (for E2F1, E2F4, sucrase-isomaltase and actin) SDS-PAGE. Proteins were analyzed by Western blotting with specific antibodies to pRb, p107, p130, E2F1, E2F4, sucrase-isomaltase and actin as described in Materials and Methods. pRb<sup>P</sup>, p107<sup>P</sup>, p130<sup>P</sup> : hyperphosphorylated forms of pRb, p107 and p130 respectively. B. HIEC cells were harvested at 70% confluence (-2 days) and 5 days post-confluence. Cell extracts (800 µg) were immunoprecipitated with anti-E2F4 followed by Western blotting with specific antibodies to E2F4, pRb, p130 and p107 (not shown). Western blotting on total cell lysate was also performed in order to confirm the total expression of the proteins.

**Fig. 2. Localization of E2F and Rb proteins in human intestinal epithelial cells.** Subconfluent growing HIEC (A), confluent HIEC (data not shown) and PCDE (B) were fixed with methanol/acetone and permeabilized with a solution of 0.1% Triton X-100 for immunofluorescence and co-staining for E2F1, E2F4, pRb, p107, p130, Ki67 and nucleolar antigen. Bars : 25 µm.

**Fig. 3 : Differential expression of E2F1 and E2F4 in human fetal intestinal epithelium.** Frozen sections of human fetal intestine between 18 to 20 weeks of gestation were stained with antibodies against E2F1 (A), E2F4 (B) and Ki67 (C). Crypt-villus axis is oriented perpendicularly in all panels, with crypts at the bottom. A-C : Bars : 25  $\mu$ m.

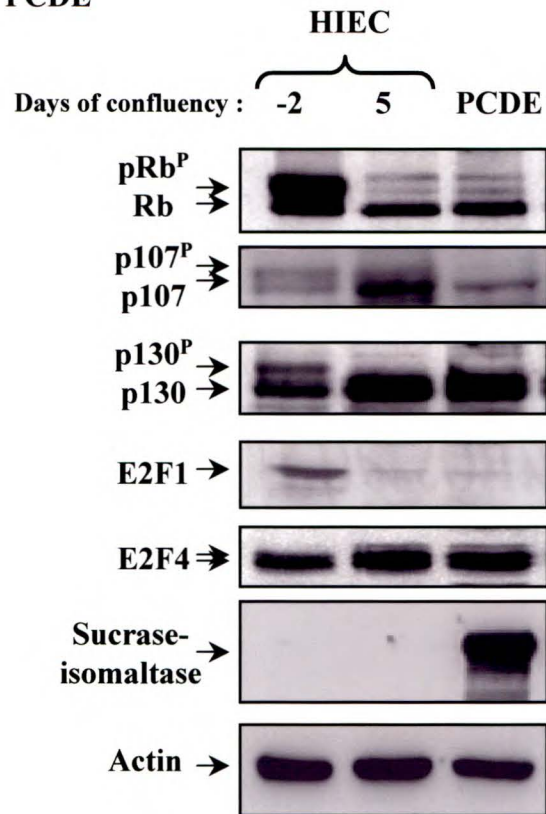
**Fig. 4 : The abundance of E2F4 in the nucleus fluctuates in a cell cycle-dependent manner.** A. Subconfluent HIEC were serum-starved for 36 h and then stimulated with 5% FCS for 8, 16 and 24 h. Equal amounts of whole cell lysates were separated by 7.5% (for pRb) or 10% (for Cdk2) SDS-PAGE, and proteins were analyzed by Western blotting with specific antibodies to pRb and Cdk2 (Rb-P : hyperphosphorylated Rb). B. Subconfluent HIEC were serum-starved for 36 h and then stimulated with 5% FCS for 3 and 24 h. Thereafter, cells were fixed with methanol/acetone and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for subsequent immunofluorescence staining of E2F1 and E2F4. Bar : 25  $\mu$ m.

**Fig. 5 : Serine/Threonine phosphorylation of E2F4 promotes its cytoplasmic localization.** A. Subconfluent HIEC were serum-starved for 36 h and then stimulated with 5% FCS for 16 h. Microcystin-LR (25  $\mu$ M) and vanadate (100  $\mu$ M) were added during the last 3 h of serum treatment. Thereafter, cells were fixed with methanol/acetone and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for subsequent immunofluorescence staining of E2F1, E2F4, p130 (not shown) and C/EBP $\beta$  (not shown). Bar : 25  $\mu$ m. B. Serum-deprived HIEC cells were stimulated with 5% FCS and subsequent cell extracts (800  $\mu$ g) were immunoprecipitated with anti-E2F4 followed by Western blotting with specific antibodies

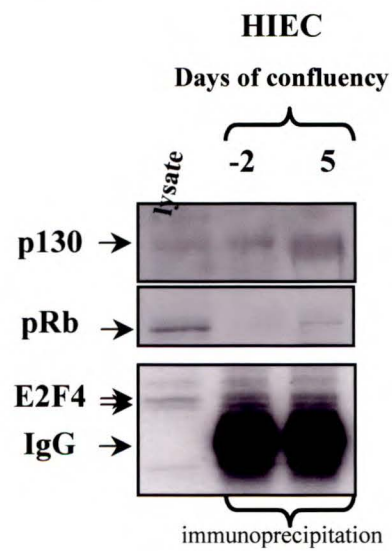
to proteins phosphorylated on serine and threonine residues, as described in Materials and Methods.

**Fig. 6 : Inhibition of p38 MAP Kinase pathway is sufficient to trigger E2F4 into the nucleus and to induce its transcriptional activity.** A. Subconfluent HIEC were serum-starved for 24 h and subsequently stimulated with DMSO (0.1%), H89 (5  $\mu$ M), Gö6976 (250 nM), lithium (20 mM) or SB203580 (20  $\mu$ M) for 16 h. Thereafter, cells were fixed with methanol/acetone and permeabilized with 0.1% Triton X-100 followed by immunofluorescence staining of E2F4. Bar : 25  $\mu$ m. B. Subconfluent HIEC were co-transfected with 0.1  $\mu$ g of DHFR-luciferase, 0.25  $\mu$ g of the relevant expression vector (pcDNAneo 3) containing or not E2F4. On the following day, cells were incubated with or without 20  $\mu$ M SB203580 and luciferase activity was measured 24 h thereafter according to the Promega protocol. The increase in luciferase activity was calculated relative to control levels of DHFR-luciferase obtained in pcDNAneo3-transfected cells, which was set at 1. Results are the mean  $\pm$  SE of at least 3 separate experiments. \*Significantly different from control (pcDNAneo3) and \*\* significantly different from E2F4 at  $p < 0.05$  (Student *t* test).

### A. HIEC versus PCDE

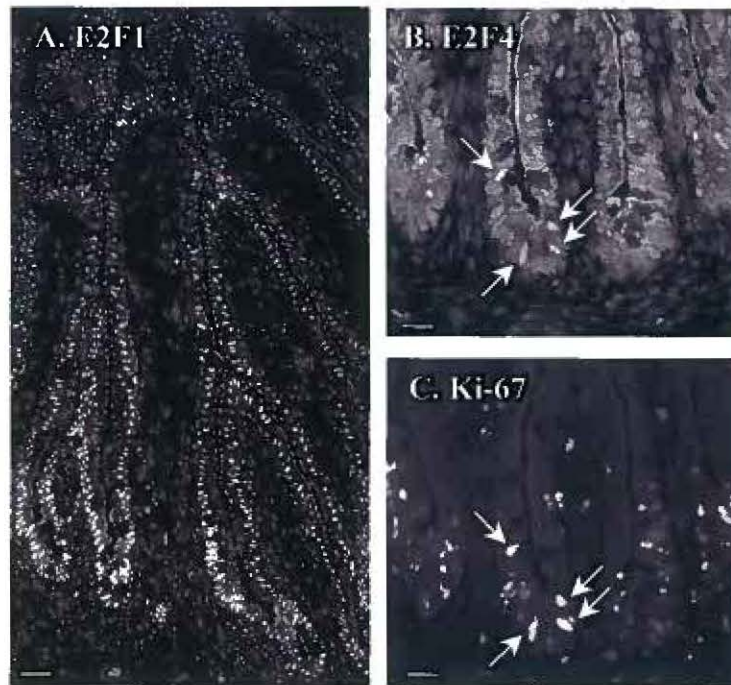


### B. Ip : $\alpha$ -E2F4, WB : $\alpha$ -p130 or $\alpha$ -pRb



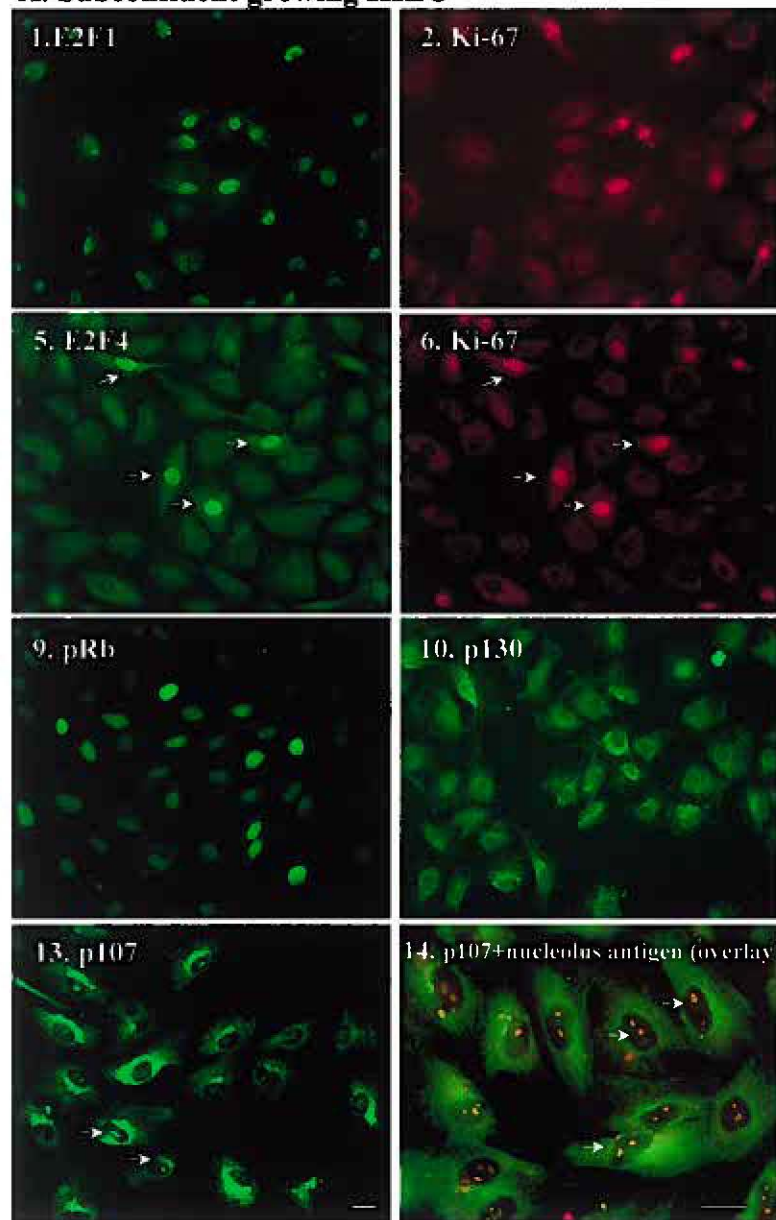
**Figure 1**

### Human fetal intestinal epithelium

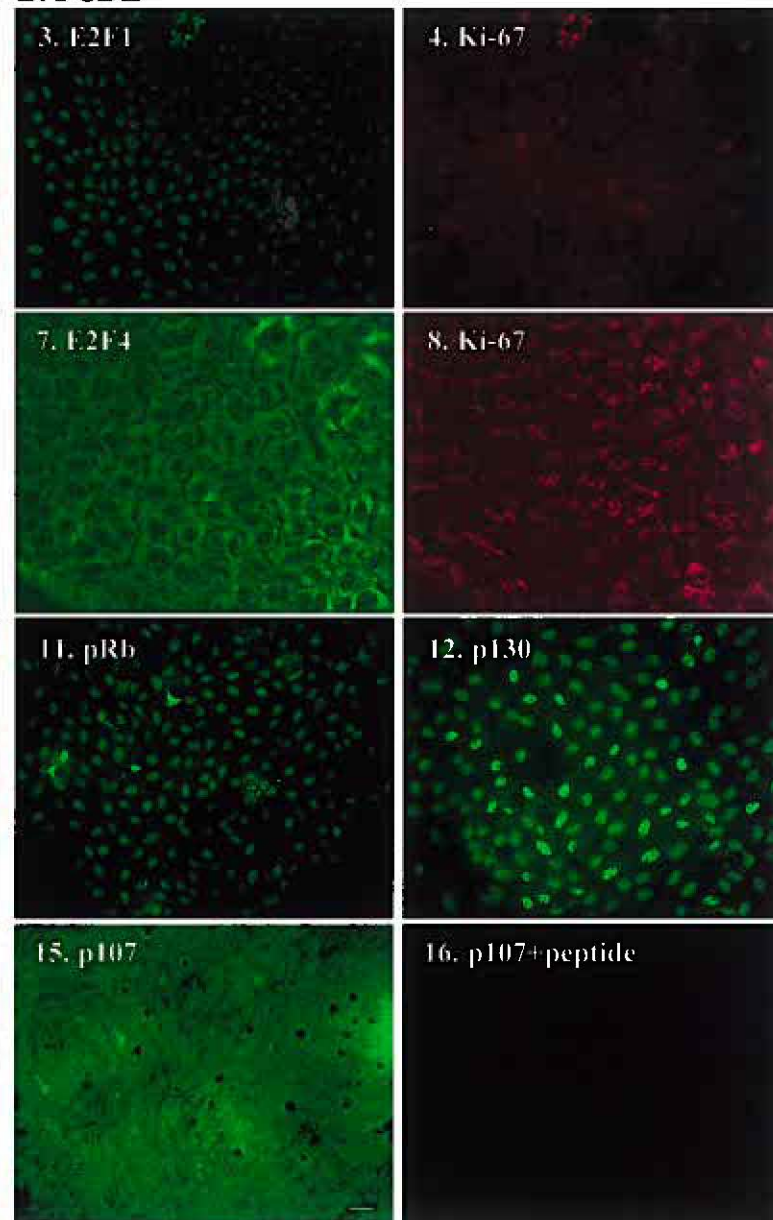


**Figure 2**

**A. Subconfluent growing HIEC**



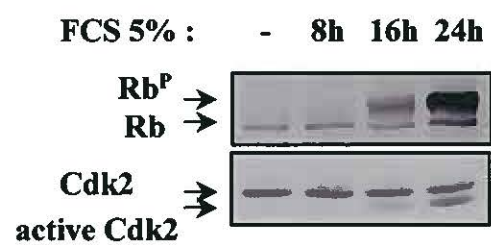
**B. PCDE**



**Figure 3**



A.



B.

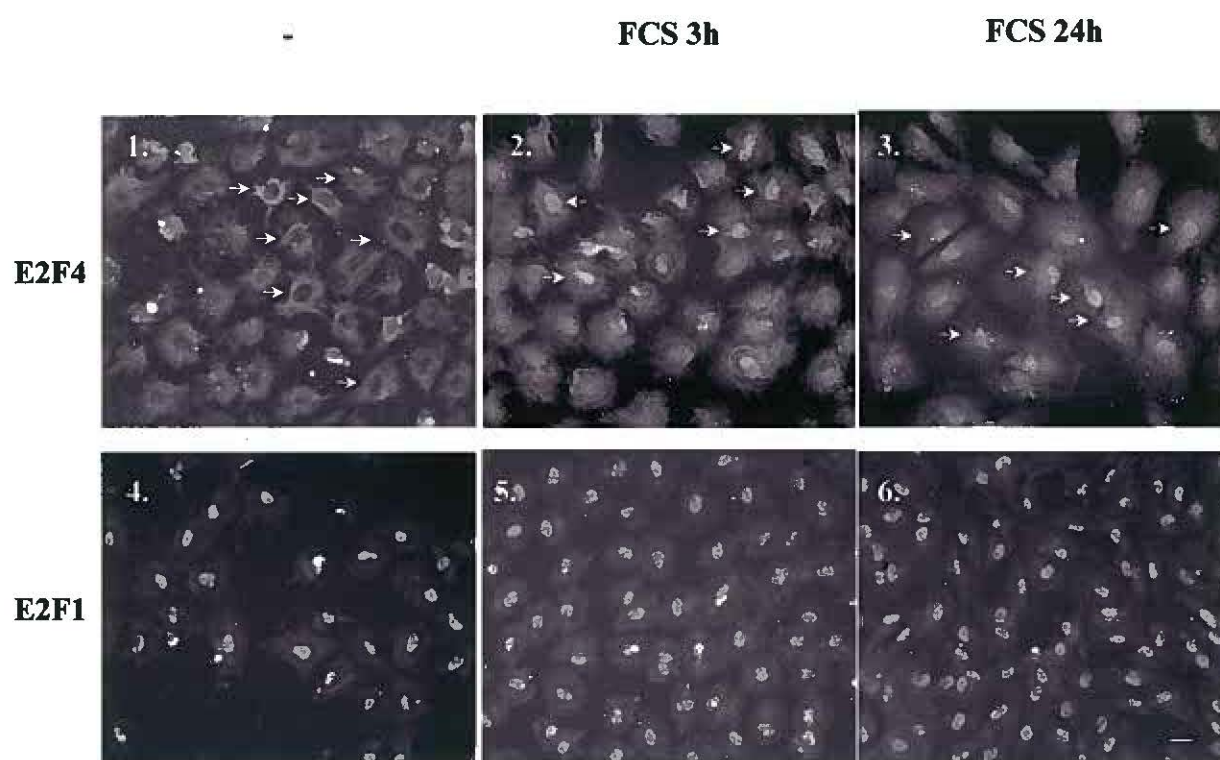
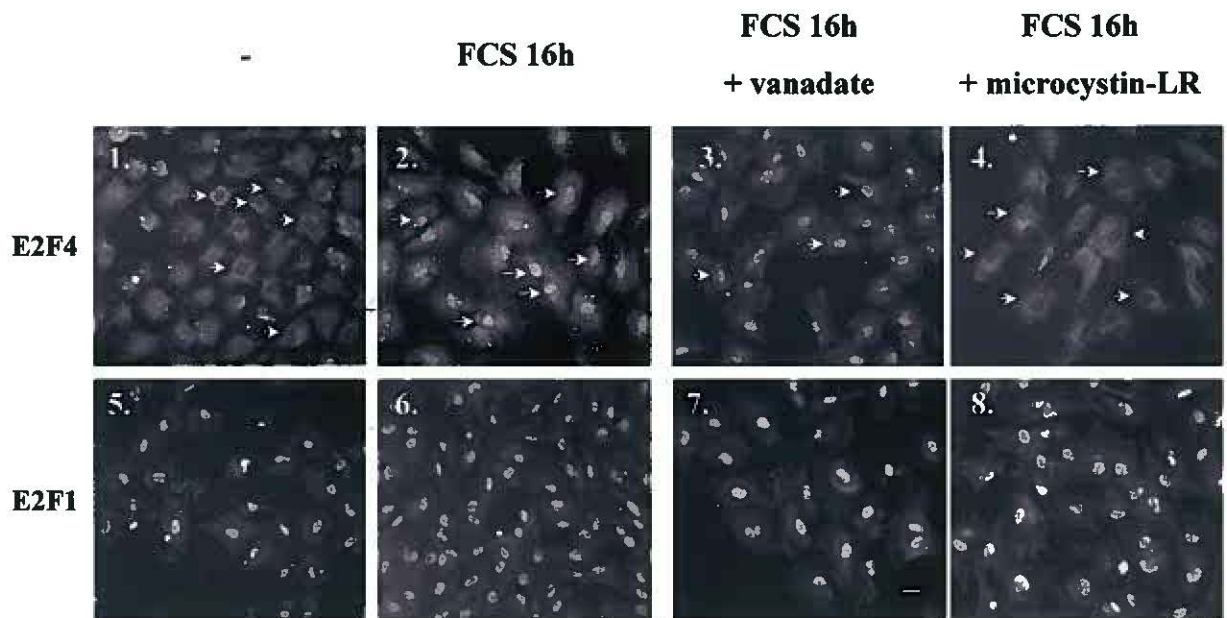
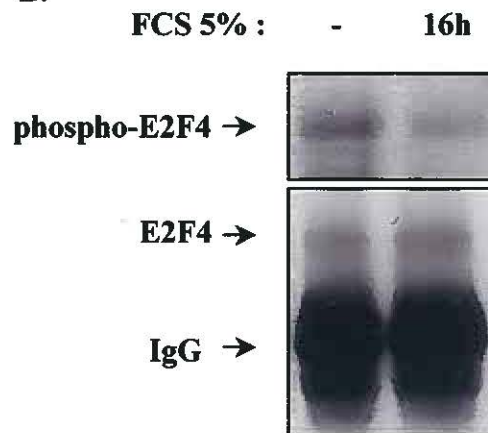


Figure 4

**A.**



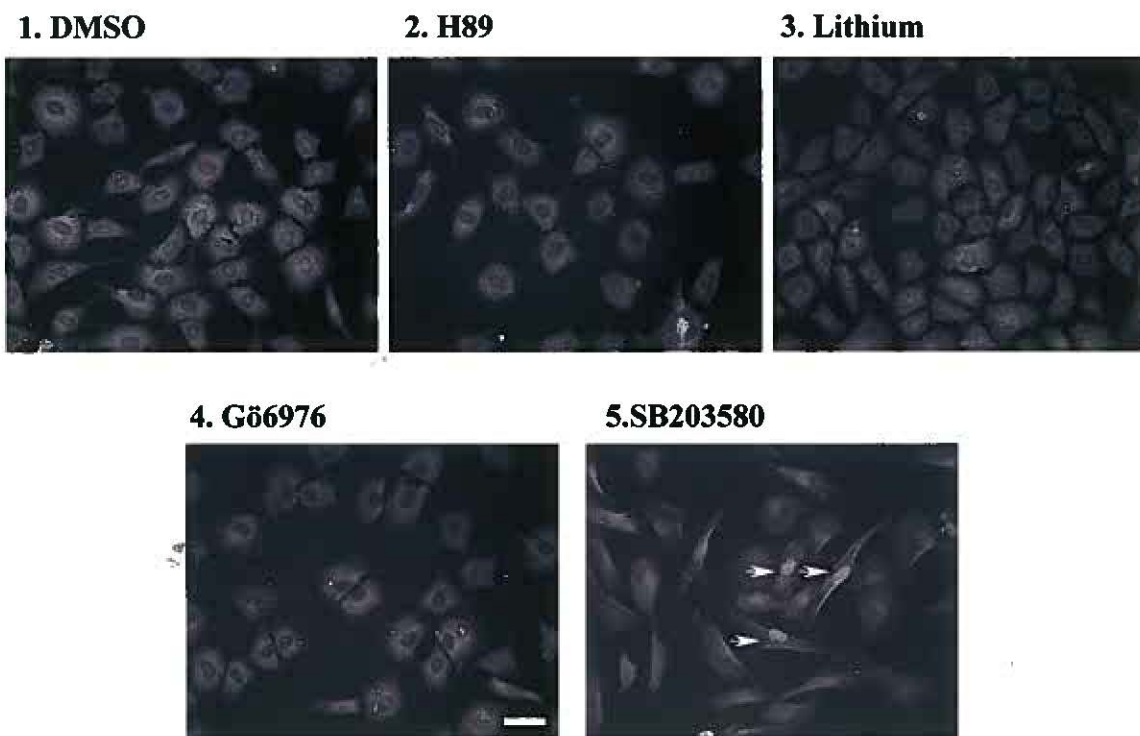
**B.**



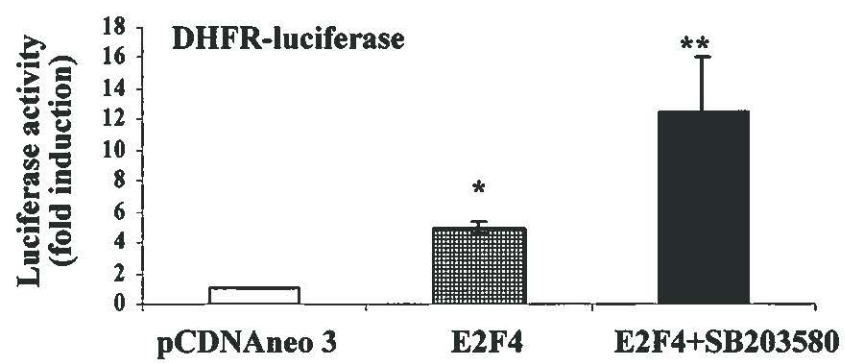
**Figure 5**



**A.**



**B.**



**Figure 6**

### **Article 3**

**Gheorghiu, I., C. Deschênes, M. Blais, F. Boudreau, N. Rivard et C. Asselin (2001)**  
Role of specific CCAAT/Enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells.  
J. Biol. Chem. 276: 44331-44337.

**Gheorghiu, I., Deschênes, C., Blais, M., Boudreau, F., Rivard, N., & Asselin, C. (2001).**

**Role of Specific CCAAT/Enhancer-binding Protein Isoforms in Intestinal**

**Epithelial Cells\*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 44331-44337.**

**<https://doi.org/10.1074/jbc.M107591200>**

## DISCUSSION

Les travaux présentés dans cette thèse permettent de mieux comprendre comment se fait la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales au niveau du cycle cellulaire.

La première étude a d'abord permis de faire une corrélation entre la différenciation entérocytaire et un arrêt du cycle cellulaire. Effectivement, un arrêt de prolifération est nécessaire pour permettre à des cellules de se différencier de façon terminale. Pour entamer leur programme de différenciation, les cellules vont arrêter leur prolifération en phase G1 du cycle cellulaire (Pardee, 1989). Les protéines impliquées dans la transition G1/S sont donc susceptibles d'être impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire nécessaire à cette différenciation.

L'inactivation des protéines de la famille Rb est un élément clé dans la progression du cycle cellulaire (Mulligan et Jacks, 1998). Les études dans les cellules Caco-2/15, les HIEC ainsi que les PCDE montrent bien que les formes hypophosphorylées des protéines de la famille Rb (pRb, p107 et p130) deviennent apparentes lorsque ces cellules atteignent la confluence et cessent de proliférer (Caco-2/15 et HIEC). Cette diminution de la phosphorylation des protéines de la famille Rb corréle aussi avec une inhibition de l'activité de cdk2. De façon inverse, la confluence cellulaire, du moins chez les cellules Caco-2/15, amène une augmentation de l'expression de marqueurs de différenciation tels que la sucrase-isomaltase et la villine. Ces premiers résultats démontrent bien qu'un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 est observé lors de l'induction de la différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines.

L'analyse des protéines régulatrices de la phase G1 a permis d'identifier des protéines susceptibles d'être responsables de l'arrêt de prolifération des cellules épithéliales intestinales. La différenciation des cellules Caco-2/15 est caractérisée par une modulation différentielle de l'expression des cyclines D (1-3). Effectivement, on remarque que l'expression de la cycline D2 est diminuée alors que l'expression des cyclines D1 et D3 est légèrement augmentée. Une modulation semblable dans l'expression de ces protéines a déjà été observée dans la lignée parentale Caco-2 ainsi que dans les cellules thermosensibles tsFHI induites à se différencier (Gartel et al., 1996; Tian et Quaroni, 1999). Les principales voies connues pour réguler l'expression de la cycline D1, soit les voies ras/MAPK et  $\beta$ -caténine/TCF, sont altérées dans les cancers colo-rectaux (Bos, 1995; Kolligs et al., 2002). De ce fait, l'expression de cette cycline est fréquemment dérégulée dans plusieurs cancers colo-rectaux (Palmqvist et al., 1998). Il n'est donc pas surprenant de voir que la cycline D1 est toujours exprimée dans les cellules Caco-2/15 non-prolifératives et différenciées. Pour ce qui est de la cycline D3, une augmentation de son expression a déjà été rapportée pendant la différenciation des cellules musculaires et il semblerait que l'induction de son expression jouerait un rôle important dans l'arrêt du cycle cellulaire nécessaire à la différenciation (Bartkova et al., 1998; Cenciarelli et al., 1999). Par contre, lorsqu'on regarde du côté des cellules normales comme les HIEC et les PCDE, on peut remarquer que la modulation de l'expression des cyclines est différente puisque l'expression de la cycline D1 est faible dans les cellules non-prolifératives PCDE par rapport aux cellules prolifératives HIEC ce qui est en accord avec les observations faites dans plusieurs types cellulaires.

D'autres protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire avaient cependant des modulations d'expression très intéressantes pendant la différenciation des

cellules Caco-2/15: les inhibiteurs de la famille des Cip/Kip soit p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> et p57<sup>Kip2</sup>. Ces trois protéines sont induites de façon différentielle pendant la différenciation des cellules Caco-2/15. On remarque premièrement que l'expression de p21<sup>Cip1</sup> est induite de façon transitoire alors que celle de p57<sup>Kip2</sup> augmente dès l'atteinte de la confluence et reste relativement constante tout au cours du processus de différenciation. L'expression de p27<sup>Kip1</sup> quant à elle augmente de façon constante dès l'atteinte de la confluence, mais aussi tout au long du processus de différenciation. De plus, des études de co-immunoprécipitation montrent que seulement p27<sup>Kip1</sup> et p57<sup>Kip2</sup> interagissent avec cdk2 pour inhiber son activité. Le patron d'expression de ces inhibiteurs est aussi différent au niveau de l'épithélium intestinal. p21<sup>Cip1</sup> est exprimé principalement au niveaux des noyaux de quelques cellules de la crypte et ces cellules sont non-prolifératives. Les inhibiteurs p27<sup>Kip1</sup> et p57<sup>Kip2</sup> sont surtout retrouvés dans les noyaux des cellules pleinement différenciées de la villosité. L'analyse de l'expression de ces inhibiteurs *in vivo* et *in vitro* laisse donc suggérer un rôle différent pour chacun d'entre eux.

La localisation de p21<sup>Cip1</sup> dans l'intestin foetal humain avait déjà été rapportée (Quaroni et Beaulieu, 1997). Parce que cette protéine est retrouvée dans les cellules non-prolifératives de la crypte, on peut penser qu'elle joue un rôle dans le processus de différenciation de cellules intestinales en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 des cellules déterminées à se différencier. Cependant, il semble que p21<sup>Cip1</sup> ne soit pas nécessaire au maintien du phénotype différencié. Plusieurs autres études démontrent un rôle semblable pour p21<sup>Cip1</sup> pendant la différenciation de plusieurs types cellulaires. Au niveau du côlon, chez la souris, p21<sup>Cip1</sup> est exprimé seulement dans les cellules ayant cessé de proliférer et ayant débuté leur processus de différenciation (Gartel et al., 1996).

Dans les cellules de la peau, l'expression de p21<sup>Cip1</sup> est induite dans les cellules adjacentes au compartiment prolifératif, mais diminue à mesure que celles-ci se différencient (Di Cunto et al., 1998). D'ailleurs, l'expression ectopique de p21<sup>Cip1</sup> dans les kératinocytes inhibe l'expression de marqueurs de différenciation tant au niveau protéique qu'au niveau de l'ARNm (Di Cunto et al., 1998).

L'inhibiteur p57<sup>Kip2</sup> semble, quant à lui, impliqué dans l'inhibition de la prolifération de par son association avec cdk2 dans les cellules Caco-2/15 confluentes. Il est bien connu que cet inhibiteur possède une affinité plus forte pour cdk2 par rapport à cdk4 et cdk6 (Lee et al., 1995).

Contrairement à p21<sup>Cip1</sup> et p57<sup>Kip1</sup>, l'expression de p27<sup>Kip1</sup> augmente de façon très importante pendant la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Une augmentation de l'expression de cet inhibiteur a aussi été rapportée pendant la différenciation de plusieurs types cellulaires comme les kératinocytes (Harvat et al., 1998). Cependant, comme l'expression de p27<sup>Kip1</sup> continue d'augmenter bien après que les cellules aient cessé de proliférer, il a été intéressant de déterminer si cet inhibiteur pouvait jouer un rôle dans le processus de différenciation autrement qu'en inhibant les complexes cyclines/cdks. Par la génération de cellules antisens p27<sup>Kip1</sup> (Asp27), nous avons démontré que la diminution de l'expression de cet inhibiteur altère de façon importante le processus de différenciation entérocytaire en diminuant l'expression et l'activité de marqueurs de différenciation comme la villine, la sucrase-isomaltase et la phosphatase alcaline. De plus, l'expression ectopique de p27<sup>Kip1</sup> induit de façon significative l'activité du promoteur de la sucrase-isomaltase, ce qui n'est pas observé lorsque p21<sup>Cip1</sup> ou p57<sup>Kip2</sup> sont surexprimés. Ce rôle dans la modulation de l'activité de promoteur n'est pas unique puisque l'expression ectopique de p27<sup>Kip1</sup>, et non p57<sup>Kip2</sup>,

induit de façon significative l'activité du promoteur de la MBP (Myelin Basic Protein), marqueur de différenciation des oligodendrocytes (Miskimins et al., 2002). Cette modulation de l'activité de promoteur de la MBP se fait d'ailleurs en collaboration avec des facteurs de transcription de la famille Sp1 (Wei et al., 2003). D'autres équipes donnent aussi à l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> un rôle important dans la différenciation des cellules intestinales. Dans les cellules HT29, des cellules provenant d'un cancer du côlon, la surexpression de p27<sup>Kip1</sup>, et non de p21<sup>Cip1</sup>, augmente l'expression de la phosphatase alcaline (Yamamoto et al., 1999). De plus, la surexpression de p27<sup>Kip1</sup> dans les cellules HIEC a aussi amenée une induction de la différenciation démontrée par une augmentation de la densité de microvillosités à la membrane apicale et par l'expression de marqueurs de différenciation tels que l'animopeptidase N et la DPPIV (Quaroni et al., 2000). Un rôle pour p27<sup>Kip1</sup> dans la différenciation de plusieurs autres tissus commence aussi à émerger. Chez les kératinocytes, la diminution de l'expression de p27<sup>Kip1</sup> par des oligonucléotides antisens prévient la différenciation de ces cellules et ce, en diminuant l'expression de protéines telles que la kératine-1, l'involucrine et la cornifine. Bien entendu, ces effets sont observés de façon indépendante du cycle cellulaire (Hauser et al., 1997). Plus récemment encore sont les travaux étudiant le rôle de p27<sup>Xic1</sup>, l'homologue de p27<sup>Kip1</sup> chez *Xenopus*, dans la différenciation des cellules musculaires et neuronales. Ces travaux démontrent que l'ablation de p27<sup>Xic1</sup> prévient la différenciation des cellules musculaires et des neurones alors que sa surexpression promouvoit la différenciation de ces cellules. Il semble aussi que l'habilité de p27<sup>Xic1</sup> à promouvoir la différenciation est séparable de son habilité à inhiber le cycle cellulaire. Dans les cellules musculaires, p27<sup>Xic1</sup> peut même synergiser avec le facteur de transcription MyoD afin d'induire la différenciation (Vernon et Philpott, 2003; Vernon et al., 2003). Ces résultats ressemblent étrangement au rôle joué



par p57<sup>Kip2</sup> dans la différenciation des cellules musculaires. MyoD est un facteur de transcription très important dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules musculaires (Nadal-Ginard, 1978). Il induit la différenciation en amenant un arrêt du cycle cellulaire et en induisant l'expression de plusieurs protéines nécessaires à la différenciation des cellules musculaires (Olsen, 1992; Weintraub et al., 1989). Certains travaux suggèrent que ce facteur de transcription peut être phosphorylé par le complexe cycline E/cdk2 dans les cellules prolifératives et que cette phosphorylation amène la dégradation de MyoD (Song et al., 1998; Kitzmann et al., 1999; Tintignac et al., 2000). L'inhibiteur p57<sup>Kip2</sup>, qui est fortement exprimé dans les cellules musculaires différenciées, peut jouer un rôle dans la stabilité de MyoD indirectement *via* son association avec le complexe cycline E/cdk2 dans les cellules non-prolifératives et différenciées (Reynaud et al., 1999). Il semble cependant que p57<sup>Kip2</sup> peut aussi jouer un rôle dans la régulation de l'activité de MyoD et ce, indépendamment de son rôle d'inhibiteur. En effet, p57<sup>Kip2</sup> peut aussi interagir directement avec MyoD et ainsi augmenter sa demie-vie (Reynaud et al., 2000). Il est donc facile de penser que p27<sup>Kip1</sup> pourrait jouer un rôle semblable pendant la différenciation des cellules épithéliales intestinales. En effet, p27<sup>Kip1</sup> pourrait moduler la différenciation en régulant, directement ou indirectement, l'activité du facteur de transcription cdx2 qui est une protéine très importante pour la différenciation des cellules intestinales puisqu'elle module l'expression de protéines telles que la sucrase-isomaltase et la lactase (Fang et al., 2000; Suh et Traber, 1996). Des travaux menés dans notre laboratoire par Jim Boulanger sont d'ailleurs en cours pour étudier le rôle de p27<sup>Kip1</sup> et cdk2 dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription cdx2. En effet, p27<sup>Kip1</sup> semble augmenter la capacité de liaison à l'ADN de cdx2 ainsi que son potentiel de transactivation (Boulanger et al., en préparation).

Il reste cependant qu'aucune anormalité n'a été détectée au niveau de l'épithélium intestinal des souris  $p27^{-/-}$  (Kiyokawa et al., 1996; Fero et al., 1996; Nakayama et al., 1996). Ceci pourrait cependant être expliqué par une certaine redondance entre les différents inhibiteurs et que la perte d'un membre pourrait être compensée par un autre. En effet, les souris nulles pour  $p16^{Ink4a}$ ,  $p21^{Cip1}$  et  $p27^{Kip2}$  se développent tout à fait normalement ce qui suggère une redondance entre les différents inhibiteurs (Deng et al., 1995; Serrano et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Fero et al., 1996; Nakayama et al., 1996). La génération des souris doubles mutantes  $p21^{-/-}/p57^{-/-}$  présente par contre des problèmes majeurs au niveau de la différenciation des cellules musculaires. En fait, une hyperprolifération des myoblastes est observée et ces myoblastes sont incapables de former des myotubes montrant bien que la perte de deux inhibiteurs peut affecter le processus de différenciation cellulaire (Zhang et al., 1999). Un phénomène de compensation est d'ailleurs observé dans les cellules Asp27. En effet, malgré la diminution d'environ 50% de l'expression de  $p27^{Kip1}$ , il y a tout de même apparition de la forme hypophosphorylée de pRb à l'atteinte de la confluence. La diminution de l'expression de  $p27^{Kip1}$  n'affecte donc pas l'arrêt en G1 des cellules Caco-2/15 à l'atteinte de la confluence. Cet arrêt en phase G1 peut peut-être s'expliquer par la plus forte expression de l'inhibiteur  $p57^{Kip2}$  dans les cellules Asp27 par rapport aux cellules contrôles. Ses résultats ne sont pas sans précédents puisqu'une coopération entre  $p27^{Kip1}$  et  $p57^{Kip2}$  a déjà été observée dans le contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de la différenciation des trophoblastes (Zhang et al., 1998).

Malgré le fait que les souris  $p27^{-/-}$  ne sont pas prédisposées à l'apparition de tumeurs spontanées, cet inhibiteur semble tout de même impliqué dans le processus de tumorigénèse puisque les souris déficientes en  $p27^{Kip1}$  traitées avec des agents mutagènes

montrent une prédisposition au développement de tumeurs dans plusieurs tissus (Fero et al., 1998). De plus, chez l'humain il existe une corrélation inverse entre l'expression de p27<sup>Kip1</sup> et le degré de différenciation des tumeurs dans plusieurs types de cancers dont les cancer colo-rectaux (Claparrone et al., 1998; Sgambato et al., 1999; Fredersdorf et al., 1997). Cet inhibiteur est donc largement utilisé comme marqueur dans l'étude des tumeurs d'où l'importance d'une meilleure compréhension de sa régulation.

Cette première étude démontre clairement le rôle distinct des trois membres des inhibiteurs de la famille des Cip/Kip dans la différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines. p21<sup>Cip1</sup> jouerait un rôle dans l'arrêt de prolifération, p57<sup>Kip2</sup> dans le maintien de l'arrêt de prolifération alors que p27<sup>Kip1</sup> serait impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire, mais aussi dans l'induction de marqueurs de différenciation.

Comme mentionné plus tôt, l'inactivation des protéines de la famille Rb est très importante pour la progression du cycle cellulaire (Mulligan et Jacks, 1998). Cette inactivation amène la libération des facteurs de transcription E2F. Ces facteurs de transcription sont importants dans la progression du cycle cellulaire puisqu'ils modulent l'expression de protéines impliquées dans la transition G1/S ainsi que dans la synthèse d'ADN (Slansky et Farnham, 1996). En fait, l'expression ectopique de ces facteurs de transcription est suffisante pour permettre l'entrée en phase S du cycle cellulaire et ce, indépendamment de l'activité des complexes cyclines/cdks de la phase G1 (Johnson et al., 1993).

Les résultats présentés ici démontrent bien le rôle important que jouent les facteurs de transcription E2F1 et E2F4 dans la progression du cycle cellulaire des cellules épithéliales intestinales humaines. En effet, les deux protéines sont retrouvées au niveau

du noyau des cellules prolifératives et transactivent des gènes importants pour la progression du cycle cellulaire comme la DHFR. Il avait déjà été démontré d'ailleurs, chez la souris, que E2F4 était surtout exprimé dans les zones prolifératives de l'intestin (Dagnino et al., 1997). La génération de souris E2F4<sup>-/-</sup> a cependant vraiment permis de démontrer le rôle important que joue E2F4 dans la prolifération des cellules intestinales. En effet, dans l'intestin de ces souris, le nombre de cryptes est réduit et les villosités sont plus courtes et plus minces que dans les souris contrôles. Ces résultats suggèrent que E2F4 pourrait jouer un rôle dans l'établissement et/ou le maintien de la crypte (Rempel et al., 2000). D'ailleurs, la régulation du système Rb/E2F est très importante dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal puisque l'expression de l'antigène T de SV40 entraîne une rentrée dans le cycle cellulaire des entérocytes différenciés de la villosité (Kim et al., 1994).

Nous avons démontré trois différents mécanismes par lesquels l'activité des facteurs de transcription E2F peut être modulée pour permettre un arrêt du cycle et la différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines. Le premier mécanisme consiste à une modulation dans l'expression de ces facteurs de transcription. Dans les cellules intestinales, E2F4 est exprimé de façon constitutive tout le long du cycle cellulaire et autant dans les cellules non-différenciées que différenciées. Par contre, l'expression de E2F1, qui est élevée dans les cellules HIEC sous-confluentes, diminue de façon importante dans les cellules HIEC confluentes ainsi que dans les cellules différenciées (PCDE). Cette modulation de l'expression des facteurs de transcription E2F a été également observée dans d'autres types cellulaires. La différenciation des cellules PC12 est en effet caractérisée par une diminution de l'expression de E2F1 et E2F5 alors

que la différenciation des kératinocytes est accompagnée d'une diminution de l'expression de E2F1 (Persengiev et al., 1999; Paramio et al., 2000).

Le deuxième mécanisme consiste en une séquestration des facteurs de transcription E2F par les protéines de la famille Rb. En effet, l'association des facteurs de transcription E2F avec les différentes protéines de la famille Rb empêche ces facteurs de moduler positivement la transcription (Harbour et Dean, 2000). Ce phénomène est observé dans les cellules HIEC confluentes où l'on remarque une augmentation de l'association entre le facteur de transcription E2F4 avec pRb et p130. D'ailleurs, l'expression de p130 augmente dans les cellules HIEC confluentes ainsi que dans les PCDE par rapport aux cellules prolifératives. La formation de complexes E2F/p130 est très caractéristique des cellules quiescentes (Smith et al., 1996) et d'ailleurs, la différenciation de la lignée parentale Caco-2 est caractérisée par une augmentation de la formation des complexes impliquant p130 (Ding et al., 2000). Une augmentation de l'expression de pRb et p130 a aussi été observée pendant la différenciation des myoblastes en myotubes (Kiess et al., 1995). Il est donc intéressant de penser qu'une l'augmentation de l'expression de p130 et la localisation nucléaire de pRb et p130 dans cellules non-prolifératives et différenciées pourrait être un mécanisme utilisé par la cellule intestinale pour maintenir un arrêt du cycle cellulaire et induire la différenciation des cellules épithéliales intestinales. La présence de tels complexes pourrait permettre la répression de gènes qui, s'ils étaient exprimés, nuiraient au processus de différenciation entérocytaire par exemple.

Finalement, le dernier mécanisme implique un changement de localisation cellulaire. En effet, nos résultats montrent que la localisation cellulaire du facteur de transcription E2F4 varie en fonction de la phase du cycle cellulaire ainsi que selon l'état

de différenciation. Dans les cellules quiescentes et différenciées, E2F4 est surtout retrouvé au niveau du cytoplasme alors que dans les cellules prolifératives, E2F4 est retrouvé au niveau du noyau laissant suggérer que ce facteur de transcription joue un rôle majeur dans la prolifération des cellules intestinales. Ces résultats contrastent cependant avec des observations dans les fibroblastes Rat-1 où E2F4 est localisé au niveau du noyau en phase G0 et se dirige vers le cytoplasme lorsque les cellules entrent en phase S (Verona et al., 1997). Cependant, dans les myoblastes L6, E2F4 est localisé dans le cytoplasme des cellules quiescentes et transloque dans le noyau après une stimulation au sérum (Gill et Hamel, 2000). De plus, tout comme dans les cellules intestinales, la différenciation des cellules musculaires L6 est associée à une séquestration du facteur de transcription E2F4 dans le cytoplasme (Gill et Hamel, 2000). Compte tenu de la forte activité transcriptionnelle de E2F4 sur le promoteur de la DHFR, il est très logique de penser que la séquestration cytoplasmique de ce facteur de transcription est un mécanisme de contrôle de son activité transcriptionnelle puisque la formation de complexes E2F4/DP corrèle avec une entrée en phase S (Wells et al., 1997). Cependant, contrairement à E2F1, E2F2 et E2F3, E2F4 et E2F5 ne possèdent pas de séquence de localisation nucléaire (Puri et al., 1998). Pour transloquer au noyau, E2F4 doit donc s'associer à une protéine possédant un NLS. L'importation de E2F4 et E2F5 dans le noyau peut se faire via leur interaction avec les protéines de la famille Rb ou les protéines DP (Black et Azizkhan-Clifford, 1999). Il semble cependant que E2F4 puisse transloquer au noyau de façon indépendante de son association avec ces protéines dans les kératinocytes (Apostolova et al., 2002). Un des principaux partenaires de E2F4 est p130. Cependant, la translocation de E2F4 ne semble pas dépendante de son association avec cette protéine dans les cellules intestinales puisque lorsque l'un est cytoplasmique, l'autre est nucléaire (Alvarez et al., en

préparation). D'autres études seront nécessaires afin de comprendre les mécanismes de translocation nucléaire d'E2F4. Cependant, les résultats présentés ici montrent que lorsque des cellules quiescentes, où E2F4 est retrouvé majoritairement au niveau du cytoplasme, sont stimulées avec du sérum, il y a translocation nucléaire de E2F4. Cette translocation induite par le sérum est inhibée par l'ajout d'un inhibiteur de sérine/thréonine phosphatases, la microcystin-LR. Cet inhibiteur inhibe de façon spécifique les sérine/thréonine phosphatases PP1 et PP2A (MacKintosh et al., 1990). Ce résultat suggère qu'une étape de phosphorylation est impliquée dans la régulation de la localisation cellulaire de E2F4. De manière intéressante, nos études de phosphorylation *in vivo* suggèrent que la translocation nucléaire de E2F4 corrèle avec une diminution de son état de phosphorylation.

Deux mécanismes pourraient expliquer la modulation de l'état de phosphorylation de E2F4 en fonction du cycle cellulaire. La stimulation des cellules quiescentes avec le sérum pourrait soit 1- stimuler l'activité d'une protéine phosphatase ou soit 2- inhiber l'activité d'une protéine kinase. De récentes études dans les cellules d'adipocytes H1B1B avaient rapporté que la sérine/thréonine phosphatase PP2A pouvait maintenir les complexes E2F/DP sous une forme hypophosphorylée (Altiok et al., 1997). En effet, un traitement de ces cellules avec le pioglitazone, un ligand synthétique de PPAR $\gamma$ , amène une diminution de l'expression de la sous-unité catalytique de PP2A ce qui a pour conséquence une augmentation de l'état de phosphorylation du complexe E2F/DP. Cette hyperphosphorylation du complexe diminue ainsi sa capacité de liaison à l'ADN ainsi que son pouvoir de transactivation (Altiok et al., 1997). Les résultats présentés ici ne montrent cependant aucune modulation dans l'expression de la sous-unité catalytique de cette phosphatase. D'autres études seront cependant nécessaires pour étudier l'activité

des différentes sérine/thréonine phosphatases dans les cellules quiescentes par rapport aux cellules prolifératives. Il reste cependant qu'il pourrait peut-être s'agir d'une sérine/thréonine kinase dont l'activité est modulée en réponse au sérum. Le complexe cycline A/cdk2 a déjà été rapporté comme pouvant phosphoryler les facteurs de transcription E2F et ainsi diminuer leur affinité pour l'ADN (Xu et al., 1994). Cependant, la translocation nucléaire de E2F4 est observée après 3 heures de stimulation au sérum ce qui précède l'activation de cdk2 et la phosphorylation de pRb. De plus, l'activité de cdk2 est très faible pour ne pas dire nulle dans les cellules HIEC confluentes ainsi que dans les PCDE. Finalement, contrairement à E2F1, E2F2 et E2F3, E2F4 ne possède pas de domaine de liaison aux cyclines (Krek et al., 1995) laissant suggérer qu'une autre kinase que cdk2 pourrait moduler la phosphorylation de E2F4 dans les cellules intestinales.

L'activité de plusieurs kinases peut être modulée en fonction des phases du cycle cellulaire. En fait, dans les cellules intestinales, quatre sérine/thréonine kinases sont reconnues comme étant actives lorsque les cellules sont non-prolifératives. Premièrement, dans notre laboratoire, des études sur la différenciation des cellules Caco-2/15 montrent que dès l'atteinte de la confluence, alors que les cellules cessent de proliférer et commencent à se différencier, il y a une augmentation de l'activité de la MAPK p38 (Houde et al., 2001). Une augmentation de l'activité de la PKA corrèle aussi avec un arrêt de prolifération des cellules IEC-6 (Rhoads et al., 2000). L'activité de la PKC est aussi modulée à la hausse dans les cellules IEC-18 en phase G0 (Frey et al., 2000). Et finalement, l'inhibition de l'activité de la PI-3K, et par conséquent, l'activation de la GSK-3 $\beta$  corrèle avec l'arrêt de prolifération de cellules de cancer du côlon (Wang et al., 2002, Laprise et al., 2002). Les résultats présentés ici montrent cependant que seule



l'inhibition des MAP kinase p38 $\alpha/\beta$  dans les cellules HIEC quiescentes amène une relocalisation nucléaire de E2F4. Il a de plus déjà été démontré que l'activité de la p38 peut moduler la localisation cellulaire d'autres protéines comme la kinase PRAK. En effet, l'importation nucléaire de cette protéine est indépendante de l'activation de la p38, mais son exportation requière une phosphorylation médiée par la p38 (New et al., 2003). Le même phénomène peut se produire avec E2F4 où sa phosphorylation par la p38 pourrait empêcher son interaction avec une protéine possédant une séquence NLS et forcerait ainsi sa localisation cytoplasmique. Il est intéressant de noter que E2F4 possède également une séquence riche en sérine qui lui est unique. La fonction de ce domaine est inconnue, mais elle semble être la cible de plusieurs mutations dans des cas de cancers colorectaux (Ikeda et al., 1998).

Alors que le rôle des facteurs de transcription E2F est très bien connu dans la prolifération cellulaire, peu de choses sont connues quant à un rôle potentiel dans la différenciation cellulaire. Des variations d'expression ont souvent été rapportées suite à un arrêt de la prolifération et à l'initiation de la différenciation. Pour plusieurs types cellulaires, E2F4 semble jouer un rôle positif dans le processus de différenciation (Puri et al., 1997; Smith et al., 1996; Vairo et al., 1995). En effet, la surexpression de E2F4 dans les kératinocytes induit un processus de différenciation cellulaire démontré par une augmentation de l'expression de marqueur de différenciation tels que l'involucrine et la kératine 10. L'induction de ces protéines est spécifique à E2F4 puisque la surexpression de E2F1 n'a aucun effet semblable (Paramio et al., 2000). E2F4 semble aussi favoriser la différenciation cellulaire des neuroblastes (Persengiev et al., 1999). Sa surexpression accélère le processus de différenciation des cellules PC12 induite par le NGF démontrée par l'apparition de neurites beaucoup plus tôt que les cellules contrôles (Persengiev et al.,

1999). Dans les cellules intestinales cependant, l'expression ectopique de E2F1, E2F4 et E2F5 inhibe de façon très importante l'activité du promoteur de la sucrase-isomaltase (résultats non-présentés dans cette thèse). Il ne semble donc pas que ces facteurs de transcription joue un rôle majeur dans l'induction du processus de différenciation. Cependant, d'autres études seront nécessaires pour mieux évaluer le rôle potentiel de ces facteurs de transcription dans l'initiation et le maintien du phénotype différencié intestinal. Des études sur la différenciation des adipocytes a d'ailleurs déjà démontré que E2F4 inhibait la différenciation de ces cellules alors qu'elle est accélérée en absence de E2F4. Les mécanismes de régulation de la différenciation adipocytaire par E2F4 sont inconnus, mais il semble qu'ils sont indépendants de son rôle dans le cycle cellulaire puisque la présence d'un mutant de E2F4 ne possédant plus de domaine de liaison à l'ADN et aux protéines de la famille Rb inhibe autant la différenciation que la protéine de type sauvage (Landsberg et al., 2003).

Le fait que des oncoprotéines comme l'antigène T de SV40 se lie aux protéines de la famille Rb et amène une rentrée des entérocytes dans le cycle cellulaire et une hyperplasie de l'épithélium intestinal (Kim et al., 1994), est en accord avec le rôle de ces protéines dans le processus de différenciation cellulaire. En effet, pRb joue un rôle très important dans la différenciation de plusieurs types cellulaires (Gu et al., 1993; Lee et al., 1994). De plus, les souris pRb<sup>-/-</sup> meurent *in utero* et présentent plusieurs défauts dans le processus de différenciation de plusieurs tissus (Gu et al., 1993; Lee et al., 1994). La localisation nucléaire de pRb et p130 dans les cellules différenciées peut promouvoir la différenciation. Comme mentionné plus tôt, l'expression de ces protéines est augmentée pendant la différenciation des myoblastes et pRb et p130 sont détectés dans les noyaux

des myotubes (Kiess et al, 1995). pRb peut aussi interagir avec des facteurs myogéniques et ainsi promouvoir la différenciation musculaire (Gu et al, 1993).

Contrairement à p130 et pRb, la localisation cellulaire de p107 dans les cellules intestinales est très différente. En effet, p107 est exprimé au niveau du cytoplasme et du noyau, mais un marquage intense au niveau des nucléoles a aussi été observé suggérant un rôle distinct pour cette protéine dans les cellules épithéliales intestinales humaines. Cependant, cette localisation n'est pas sans précédent puisque p107 a déjà été localisé au niveau des nucléoles dans les cellules de la lutéine granulaire humaine (Green et al., 2000). p107 pourrait avoir un rôle dans les nucléoles pendant la différenciation de ces cellules en réprimant les ARNr 28S, 18S et 5/8S.

La surexpression des facteurs de transcription C/EBP dans les cellules intestinales montre que ces protéines sont impliquées dans plusieurs fonctions biologiques comme la réponse inflammatoire et notamment la prolifération cellulaire. En effet, la surexpression de C/EBP $\alpha$  et de C/EBP $\beta$  affecte la prolifération des cellules intestinales IEC-6. Tout comme dans plusieurs types cellulaires (Hendricks-Taylor et Darlington, 1995), la surexpression de C/EBP $\alpha$  p42 amène un arrêt de prolifération dans les cellules IEC-6. Dans le foie, cette inhibition de la prolifération semble dépendante de l'inhibiteur p21<sup>Cip1</sup> (Timchenko et al., 1997). Dans les cellules IEC-6 cependant, aucune modulation de l'expression de p21<sup>Cip1</sup> n'a été observée. Il reste que C/EBP $\alpha$  peut toujours inhiber la prolifération en absence de p21<sup>Cip1</sup> (Muller et al., 1999) ce qui suggère que d'autres mécanismes sont impliqués dans l'arrêt de prolifération médié par C/EBP $\alpha$ .

La surexpression de C/EBP $\beta$  LAP module aussi de façon négative la prolifération des cellules IEC-6. Les résultats démontrent que les cellules surexprimant cet isoforme ont un temps de dédoublement presque deux fois plus long que les cellules contrôles. Le rôle de C/EBP $\beta$  dans la prolifération cellulaire est assez contradictoire. En effet, C/EBP $\beta$  joue rôle positif dans la prolifération de plusieurs types cellulaires notamment chez les hépatocytes et les kératinocytes (Greenbaum et al., 1998; Zhu et al., 2002; Buck et al., 1999; Buck et al., 2001). Cependant, dans les cellules d'hépatomes, C/EBP $\beta$  inhibe la prolifération cellulaire (Buck et al., 1994). Très peu de choses sont connues cependant quant aux mécanismes de contrôle de la prolifération par C/EBP $\beta$ .

Plusieurs voies de signalisation sont importantes pour la prolifération des cellules épithéliales intestinales dont la voie des p42/p44 MAPK (Aliaga et al., 1999). L'analyse de la cinétique d'activation de ces protéines montre que l'activation des p42/p44 en réponse au sérum n'est pas altérée dans les cellules surexprimant C/EBP $\beta$  LAP par rapport aux cellules contrôles. L'expression de certaines protéines du cycle cellulaire a cependant montré des différences importantes entre les deux populations. L'entrée en phase S des cellules normales est caractérisée par une diminution de l'expression de p27<sup>Kip1</sup> ainsi que par une augmentation de l'expression des cyclines D et E (Jones et Kazlauskas, 2001). Des cinétiques détaillées de stimulation avec sérum montrent clairement que les cellules surexprimant C/EBP $\beta$  LAP ont un délai dans la diminution de l'expression de p27<sup>Kip1</sup>. De plus, le niveau d'expression des cyclines D1/D2 et E est plus faible dans les cellules surexprimant C/EBP $\beta$  LAP. Ces différentes modulations d'expression de ces protéines du cycle cellulaire ont comme conséquence de retarder

l'induction de l'hyperphosphorylation de pRb en réponse au sérum et donc l'entrée en phase S.

Des études ont déjà démontré que C/EBP $\alpha$  peut inhiber l'expression de c-myc via un site E2F situé dans le promoteur de c-myc (Johansen et al., 2001). Il semble donc que C/EBP $\alpha$  peut contrôler la prolifération en modulant l'activité des facteurs de transcription E2F. Des études de co-immunoprécipitation dans les cellules IEC-6 et Caco-2/15 montrent bien qu'une interaction est observée entre E2F4 et les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  des C/EBP et que ces complexes sont présents sur des séquences E2F. Un tel phénomène entre ces facteurs de transcription a d'ailleurs déjà été rapporté. Dans les cellules de foie, C/EBP $\alpha$  est présent dans des complexes liant l'ADN à des séquences consensus pour E2F et C/EBP $\alpha$  inhibe l'induction du promoteur de la DHFR par les complexes E2F/DP (Slomiany et al., 2000). L'inhibition de l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription E2F par les C/EBP est aussi un phénomène observé lors de la différenciation des préadipocytes. Dans ces cellules, l'expression ectopique de E2F1 est capable de bloquer l'induction du processus de différenciation induit par C/EBP $\alpha$  (Porse et al., 2001). L'effet n'est pas seulement spécifique à E2F1 puisque C/EBP $\alpha$  inhibe aussi bien la transcription dépendante de E2F4 (Porse et al., 2001). Donc, pendant le processus de différenciation adipocytaire, C/EBP $\alpha$  pourrait jouer un rôle parallèle à pRb en inhibant l'activité transcriptionnelle des E2F. D'ailleurs, une association entre pRb et les C/EBP est observée pendant la différenciation des adipocytes et une telle association favorise le processus de différenciation cellulaire (Chen et al., 1996a). La présence de complexes C/EBP/E2F pourrait donc altérer la pouvoir de transactivation des facteurs de transcription E2F dans les cellules IEC-6 et spécifiquement E2F4 qui joue un rôle très

important dans la prolifération des cellules intestinales. Ceci aurait comme résultat une diminution dans l'expression de gènes cibles des E2F, comme les cyclines D et E, et ainsi ralentir la prolifération cellulaire.

Peu de choses sont connues concernant la régulation de la prolifération et de la différenciation par les C/EBP dans l'épithélium intestinal humain. Il reste cependant que C/EBP $\alpha$  est retrouvé au niveau des cellules différenciées de la villosité chez la souris adulte et que son expression précède l'apparition de marqueurs de différenciation tels que la lactase et la phosphatase alcaline suggérant un rôle dans la régulation de la différenciation au niveau de l'épithélium intestinal (Chandrasekaran et Gordon, 1993; Montgomery et al., 1997). Il semble en effet que C/EBP $\alpha$  ainsi que C/EBP $\beta$  LAP peuvent jouer un rôle dans la différenciation entérocytaire en induisant un arrêt de prolifération nécessaire à l'induction du processus de différenciation. Il n'est cependant pas exclu que ces protéines puissent aussi jouer un rôle dans le programme de différenciation comme tel. L'association entre pRb et C/EBP $\alpha$  favorise la différenciation des préadipocytes en stimulant l'activité du promoteur de l'UCP-1, marqueur de différenciation de ces cellules (Chen et al., 1996a). De plus, pendant la différenciation des macrophages et des cellules de poumons, l'association entre pRb et 3 isoformes de C/EBP ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ) stimule l'activité transcriptionnelle des C/EBP (Chen et al, 1996b; Charles et al, 2001). D'ailleurs, il est bien connu que pRb est impliqué dans la différenciation de plusieurs autres types cellulaires dont les cellules musculaires via une interaction avec MyoD (Halevy et al., 1995; Skapek et al., 1995). Il serait donc intéressant de vérifier l'implication des facteurs de transcription C/EBP, notamment

C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$ , dans le contrôle de la différenciation au niveau de l'épithélium intestinal et de vérifier l'implication potentielle de pRb et/ou p130 dans cette régulation.

## Conclusions et Perspectives

Ces travaux ont permis de mieux comprendre l'implication de plusieurs protéines du cycle cellulaire dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Le premier manuscrit démontre clairement le rôle important que jouent les inhibiteurs de la famille Cip/Kip (p21, p27 et p57) dans l'initiation et le maintien du phénotype intestinal différencié. De plus, un nouveau rôle, autre qu'inhibiteur du cycle cellulaire a été identifié pour p27<sup>Kip1</sup>. En effet, cet inhibiteur participe au processus de différenciation entérocytaire. Des études menées dans notre laboratoire démontrent que p27<sup>Kip1</sup> contrôle l'activité transcriptionnelle de cdx2. Il semble effectivement qu'une forte expression de p27<sup>Kip1</sup> augmente la capacité de liaison et la capacité de transactivation de cdx2. D'autres études seront cependant nécessaires afin d'identifier le mécanisme d'action de p27<sup>Kip1</sup>. Il y a cependant quelques précédents dans la littérature. En effet, p57<sup>Kip2</sup> module l'activité transcriptionnelle de MyoD de manière indépendante de son association avec cdk2 (Reynaud et al., 2000). Un rôle semblable a aussi été démontré pour p27<sup>Kip1</sup> dans les cellules neuronales où ce dernier peut moduler la liaison à l'ADN du facteur de transcription Sp1 (Wei et al., 2003).

Le deuxième manuscrit a permis de démontrer que les facteurs de transcription E2F1 et E2F4 jouent un rôle très important dans la prolifération des cellules épithéliales intestinales et que l'inhibition de leur activité transcriptionnelle est essentielle à la

différenciation entérocytaire. La régulation de l'activité transcriptionnelle de ces deux facteurs de transcription est toutefois différente. Alors que l'expression de E2F1 chute dans les cellules différenciées, celle de E2F4 reste stable. Un changement de localisation cellulaire est plutôt observé et ce changement de localisation est dépendant d'une phosphorylation. Quoique la kinase p38 semble une bonne candidate dans la modulation de l'état de phosphorylation de E2F4, des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si elle joue un rôle direct ou non dans la modulation de la localisation cellulaire de E2F4. Cependant, la présence d'un «*docking site*» pour p38 dans la séquence de E2F4 laisse croire que cette kinase pourrait phosphoryler directement E2F4. Des études seront aussi nécessaires pour déterminer le ou les site(s) de phosphorylation sur E2F4. De plus, compte tenu du rôle important de ce facteur de transcription dans la prolifération des cellules intestinales, il serait intéressant d'effectuer des infections adénovirales avec E2F4, E2F4-NLS (ajout d'une séquence NLS à E2F4 de type sauvage) et aussi E2F1 pour comparer leurs effets sur la prolifération et la différenciation par exemple.

Le dernier manuscrit a permis d'éclaircir le rôle des facteurs de transcription C/EBP dans la réponse inflammatoire ainsi que sur la prolifération cellulaire. En effet, trois isoformes de C/EBP, soit  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$ , modulent l'expression de l'haptoglobine en réponse à des agents pro-inflammatoires dans les cellules intestinales. Ces facteurs de transcription jouent aussi un rôle important dans la prolifération des cellules épithéliales intestinales puisque la surexpression de C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  LAP inhibe ou ralentit la progression du cycle cellulaire. Cette modulation de la prolifération semble en grande partie due à une association entre ces protéines et les facteurs de transcription E2F. Il



serait donc intéressant de déterminer le rôle des C/EBP dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle des E2F en fonction du cycle cellulaire et dans les cellules différenciées versus les cellules non-différenciées. Il serait aussi intéressant de déterminer si les C/EBP jouent un rôle dans le processus de différenciation entérocytaire via une association avec les protéines de la famille Rb. Compte tenu du rôle important des C/EBP dans la différenciation des adipocytes, la formation d'un tel complexe pourrait peut-être moduler l'expression de marqueurs de différenciation entérocytaire.

Ces travaux mettent donc en lumière le rôle de plusieurs protéines dans le contrôle du cycle cellulaire dans les cellules intestinales épithéliales. Les facteurs de transcription E2F1 et E2F4 jouent un rôle très important dans la progression à travers les différentes phases du cycle alors que les inhibiteurs de la famille Cip/Kip, les protéines de la famille Rb ainsi que certaines isoformes de C/EBP peuvent venir contrôler cette progression dans le cycle en modulant de façon directe (pRb, C/EBP) ou indirecte (Cip/Kip) l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription E2F.

## REMERCIEMENTS

Je voudrais commencer par remercier les membres du jury, les Drs Claude Labrie, Guylain Boissonneault, Jean-François Beaulieu et Nathalie Rivard pour avoir pris le temps de lire cette thèse et de bien avoir voulu l'évaluer.

Plusieurs personnes ont été importantes pour moi à travers ces dernières années. Leur support et leur présence m'ont grandement aidé dans la réalisation de ces travaux.

Premièrement, je voudrais remercier la Dre Nathalie Rivard pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, mais aussi pour m'avoir guidée autant au niveau professionnel que personnel au cours de ces années. Un support grandement apprécié.

Un gros merci à Anne Vézina pour sa précieuse aide... et pour les nombreuses discussions. Je ne sais pas ce que j'aurais fait, si elle n'avait pas été là !

Évidemment, mes collègues de laboratoire ont tous participé de près ou de loin à la réalisation de ces travaux. Merci à Jim Boulanger, Cathia Duchesne, Patrick Laprise, Marie-Josée Boucher, Stéphanie Charland, Mathieu Houde, José Aliaga, Marie-Ève Lizotte, Marie-Pier Tétreault, Mélanie Simoneau, Fernand-Pierre Gendron et Laetitia Alvarez pour m'avoir fait rire, pleurer et aussi enrager ! J'ai vraiment apprécié les moments passés avec vous tous.

Merci aussi à ma bonne amie Julie Bellemare pour toujours avoir été là pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments.

Finalement, un merci très particulier à mes parents, Marcel et Ginette, ainsi qu'à mes sœurs Lise et Julie. Merci de m'avoir donné le goût d'apprendre et de toujours vouloir donner le meilleur de moi-même.

## RÉFÉRENCES

- Adams, P.D. (2001)** Regulation of the retinoblastoma suppressor protein by cyclin/cdks. Bioch. Biophys. Acta 1471: M123-M133.
- Agrawal, D., P. Hauser, F. McPherson, F. Dong, A. Garcia et W.J. Pledger (1996)** Repression of p27Kip1 synthesis by platelet-derived growth factor in BALB/c 3T3 cells. Mol. Cell. Biol. 16: 4327-4336.
- Akira, S., H. Isshiki, H. Sugita, O. Tanabe, S. Kinoshita, Y. Vishio, T. Nakajima, T. Hirano et T. Kishimoto (1990)** A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. EMBO J. 9: 1897-1906.
- Akira, S. et T. Kishimoto (1997)** NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation. Adv. Immunol. 65: 1-46.
- Alam, T., M.R. An et J. Papaconstantinou (1992)** Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. J. Biol. Chem. 267: 5021-5024.
- Alberts B., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et P. Walter (1998)** Essential cell Biology : An introduction to the molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York & London. 630 p.
- Alcorta, D.A., Y. Xiong, D. Phelps, G. Hannon, D. Beach et J.C. Barrett (1996)** Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 13742-13747.
- Aliaga, J.C., C. Deschênes, J.-F. Beaulieu, E.L. Calvo et N. Rivard (1999)** Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. Am. J. Physiol. 277: G631-641.
- Altiock S, M. Xu et B.M. Spiegelman (1997)** PPAR $\gamma$  induces cell cycle withdrawal : inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. Genes Dev. 11: 1987-1998.
- Antonson, P., B. Stellan, R. Yamanaka et K.G. Xanthopoulos (1996)** A novel human CCAAT/enhancer binding protein gene, C/EBPepsilon, is expressed in cells of lymphoid and myeloid lineages and is localized on chromosome 14q11.2 close to the T-cell receptor alpha/delta locus. Genomics 35: 30-38.
- Antonson, P. et K.G. Xanthopoulos (1995)** Molecular cloning, sequence, and expression patterns of the human gene encoding CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha). Biochem. Biophys. Res. Commun. 215: 106-113.

- Apostolova, M.D., I.A. Ivanova, C. Dagnino, S.J.A. D'Souza et L. Dagnino** (2002) Active nuclear import and export pathways regulate E2F-5 subcellular localization. J. Biol. Chem. 277: 34471-34479.
- Atadja, P., H. Wong, I. Garkavtsev, C. Veillette et K. Riabowol** (1995) Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8348-8352.
- Bagchi S., R. Weinmann et P. Raychaudhuri** (1991) The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. Cell 65: 1063-1072.
- Baldi, A., A. De Luca, P.P. Claudio, F. Baldi, G.G. Giordano, M. Tommasino, M.G. Paggi et A.E. Giordano** (1995) The Rb2/p130 gene product is a nuclear protein whose phosphorylation is cell cycle regulated. J. Cell. Biochem. 59: 402-408.
- Bandara, L.R. et N.B. La Thangue** (1991) Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. Nature 351: 494-497.
- Bartkova, J., J. Lukas, M. Stauss et J. Bartek** (1998) Cyclin D3 : requirement for G1/S transition and high abundance in quiescent tissues suggest a dual role in proliferation and differentiation. Oncogene 17: 1027-1037.
- Beaulieu J.F. et A. Quaroni** (1991) Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. Biochem J. 280: 599-608.
- Benjamini, E., G. Sunshine et S. Leskowitz** (1996) Immunology: a short course. 3<sup>e</sup> édition, Wiley-Liss, New York, 484 p.
- Birkenmeier, E.H., B. Gwynn, S. Howard, J. Jerry, J.I. Gordon, W.H. Landschulz et S.L. McKnight** (1989) Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein. Genes Dev. 3: 1146-1156.
- Black A.R. et J. Azizkhan-Clifford** (1999) Regulation of E2F : a family of transcription factors involved in proliferation control. Gene 237: 281-302.
- Blais, A., D. Monte, F. Pouliot et C. Labrie** (2002) Regulation of the human cyclin-dependent kinase inhibitor p18INK4c by the transcription factors E2F1 and Sp1. J. Biol. Chem. 277: 31679-31693.
- Bos, J.L.** (1995) p21ras: an oncoprotein functioning in growth factor-induced signal transduction. Eur. J. Cancer 31A: 1051-1054.

- Boudreau, F., S. Blais et C. Asselin** (1996) Regulation of CCAAT/enhancer binding protein isoforms by serum and glucocorticoids in the rat intestinal epithelial crypt cell line IEC-6. Exp. Cell. Res. 222: 1-9.
- Brittan, M. et N.A. Wright** (2002) Gastrointestinal stem cells. J. Pathol. 197: 492-509.
- Brugarolas, J., C. Chadrsekaran, J. Gordon, D. Beach, T. Jacks et G. Hannon** (1995) Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. Nature 377: 552-557.
- Buck, M., H. Turler et M. Chojkier** (1994) LAP (NF-IL-6), a tissue-specific transcriptional activator, is an inhibitor of hepatoma cell proliferation. EMBO J. 13: 851-860.
- Buck, M., V. Poli, T. Hunter et M. Chojkier** (2001) C/EBP $\beta$  phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell survival. Mol. Cell. 8: 807-816.
- Buck, M., V. Poli, P. vander Geer, M. Chojkier et T. Hunter** (1999) Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP $\beta$  is required for hepatocyte proliferation induced by TGF $\alpha$ . Mol. Cell. Biol. 4: 1087-1092.
- Burgess-Beusse, B.L. et G.J. Darlington** (1998) C/EBP $\alpha$  is critical for the neonatal acute-phase response to inflammation. Mol. Cell. Biol. 18: 7269-7277.
- Campanero, M.R. et E.K. Flemington** (1997) Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: stabilization by the pRB tumor suppressor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 2221-2226.
- Cao, Z., R.M. Umek et S.L. McKnight** (1991) Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. Genes Dev. 5: 1538-1552.
- Cenciarelli, C., F. De Santa, P.L. Puri, E. Mattei, L. Ricci, F. Bucci, A. Felsani et M. Aruso** (1999) Critical role played by cyclin D3 in the MyoD-mediated arrest of cell during myoblast differentiation. Mol. Cell. Biol. 19: 5203-5217.
- Chan, F.K.M., J. Zhang, L. Chen, D.N. Shapiro et A. Winoto** (1995) Identification of human/mouse p19, a novel cdk4/cdk6 inhibitor with homology to p16<sup>ink4</sup>. Mol. Cell. Biol. 15: 2682-2688.
- Chandrasekaran, C., C.M. Coopersmith et J.I. Gordon** (1996) Use of normal and transgenic mice to examine the relationship between terminal differentiation of intestinal epithelial cells and accumulation of their cell cycle regulators. J. Biol. Chem. 271: 28414-28421.

**Chandrasekaran, C. et J.I. Gordon** (1993) Cell lineage-specific and differentiation-dependent patterns of CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  expression in the gut epithelium of normal and transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8871-8875.

**Chang, C.J., T.T. Chen, H.Y. Lei, D.S. Chen et S.C. Lee** (1990) Molecular cloning of a transcription factor, AGP/EBP, that belongs to member of the C/EBP family. Mol. Cell. Biol. 10: 6642-6653.

**Charles, A., X. Tang, E. Crouch, J.S. Brody et Z.X. Xiao** (2001) Retinoblastoma protein complexes with C/EBP proteins and activates C/EBP-mediated transcription. J. Cell. Biochem. 83: 414-425.

**Chen, P.-L., D.J. Riley, Y. Chen et W.-H. Lee** (1996a) Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. Genes Dev. 10: 2794-2804.

**Chen, P.-L., D.J. Riley, S. Chen-Kiang et W.-H. Lee** (1996b) Retinoblastoma protein directly interacts with and activates the transcription factor NF-IL6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 465-469.

**Chittenden, T., D.M. Livingston et W.G. Kaelin Jr** (1991) The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein. Cell 65: 1073-1082.

**Chumakov, A.M., I. Grillier, E. Chumakova, D. Chih, J. Slater et H.P. Koeffler** (1997) Cloning of the novel human myeloid-cell-specific C/EBP-epsilon transcription factor. Mol. Cell. Biol. 17: 1375-1386.

**Clapparrone, M., H. Yamamoto, Y. Yao, A. Sgambato, G. Cattoratti, N. Tomita, T. Monden, H. Rotterdam et I.B. Weinstein** (1998) Localization and expression of p27KIP1 in multistage colorectal carcinogenesis. Cancer Res. 58 : 114-122.

**Classon, M. et N. Dyson** (2001) p107 and p130 : versatile proteins with interesting pockets. Exp. Cell Res. 264: 135-147.

**Coats, S., W.M. Flanagan, J. Nourse et J.M. Roberts** (1996) Requirement of p27<sup>Kip1</sup> for restriction point control of the fibroblast cell cycle. Science 272: 877-880.

**Cobrinik, D., P. Whyte, D.S. Peeper, T. Jacjs et R.A. Weinberg** (1993) Cell cycle-specific association of E2F with the p130 E1A-binding domain. Genes Dev. 7: 2392-2404.

**Cooper, C., A. Henderson, S. Artandi, N. Avitahl et K. Calame** (1995) Ig/EBP (C/EBP $\gamma$ ) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family of transcriptional activators. Nucleic Acids Res. 23:4371-4377.

- Cram, E.J., R.A. Ramos, E.C. Wang, H.H. Cha, Y. Nishio et G.L. Firestone** (1998) Role of the CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$  transcription factor in the glucocorticoid stimulation of p21<sup>waf1/cip1</sup> gene promoter activity in growth-arrested rat hepatoma cells. J. Biol. Chem. 273: 2008-2014.
- Dagnino, L., C.J. Fry, S.M. Bartley, P. Farnham, B.L. Gallie and R.A. Phillips** (1997) Expression patterns of the E2F family of transcription factors during murine development. Cell Growth Differ. 8: 553-563.
- Darlington, G.J., S.E. Ross et O.A. MacDougald** (1998) The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. J. Biol. Chem. 273: 30057-30060.
- DeCaprio, J.A., J.W. Ludlow, J. Figge, J.Y. Shew, C.M. Huang, W.H. Lee, E. Marsillio, E. Paucha et D.M. Livingston** (1988) SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. Cell 54: 275-283.
- De Luca, A., M. De Falco, A. Baldi et M.G. Paggi** (2002) Cyclin T: three forms for different roles in physiological and pathological functions. J. Cell. Physiol. 194: 101-107.
- Deng, C., P. Zhang, J.W. Harper, S.J. Elledge et P. Leder** (1995) Mice lacking p21<sup>CIP1/WAF1</sup> undergo normal development but are defective in G1 checkpoint control. Cell 82: 675-684.
- Descombes, P., M. Chojkier, S. Lichtsteiner, E. Falvey et U. Schibler** (1990) LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. Genes Dev. 4: 1541-1551.
- Descombes, P et U. Schibler** (1991) A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. Cell 67: 569-579.
- Désilets, A., I. Gheorghui, S.-J. Yu, E. G. Seidman et C. Asselin** (2000) Inhibition by deacetylase inhibitors of IL-1-dependent induction of haptoglobin involves CCAAT/Enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells. Biochem Biophys. Res. Commun. 276: 673-679.
- Di Cunto, F., G. Topley, E. Calautti, J. Hsiao, L. Ong, P.K. Seth et G.P. Dotto** (1998) Inhibition function of p21<sup>Cip1/WAF1</sup> in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control. Science 280: 1069-1072.
- Diehl, J.A., F. Zindy et C.J. Sherr** (1997) Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on serine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. Gene Dev. 11: 957-972.

**Ding, Q.-M., T.C. Ko et B.M. Evers** (1998) Caco-2 intestinal cell differentiation is associated with G1 arrest and suppression of CDK2 and CDK4. Am. J. Physiol. 275: C1193-C1200.

**Ding, Q, Wang Q, Dong Z, Evers BM** (2000) Characterization and regulation of E2F activity during Caco-2 cell differentiation. Am. J. Physiol. (Cell Physiol.) 278: C110-C117.

**Duchesne, C., S. Charland, C. Asselin, C. Nahmias et N. Rivard** (2003) Negative regulation of beta-catenin signaling by tyrosine phosphatase SHP-1 in intestinal epithelial cells. J. Biol. Chem. 278: 14274-14283.

**Dyson N.** (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. Genes Dev 12: 2245-2262.

**Dyson, N., P.M. Howley, K. Munger et E. Harlow** (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science 243: 934-937.

**El-Deiry, W.S., T. Tokino, V.E. Velculesco, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, D. Lin, E. Mercer, K.W. Kinzler et B. Vogelstein** (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 75: 817-825.

**Ewen, M.E., B. Faha, E. Harlow et D.M. Livingston** (1992) Interaction of p107 with cyclin A independent of complex formation with viral oncoproteins. Science 255: 85-87.

**Ewen, M.E., J.W. Ludlow, E. Marsilio, J.A. DeCaprio, R.C. Millikan, S.H. Cheng, E. Paucha et D.M. Livingston** (1989) An N-terminal transformation-governing sequence of SV40 large T antigen contributes to the binding of both p110Rb and a second cellular, p120. Cell 58: 257-267.

**Ewen, M.E., Y. Xing, J.B. Lawrence et D.M. Livingston** (1991) Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. Cell 66: 1155-1164.

**Faha, B., M.E. Ewen, L.H. Tsai, D.M. Livingston et E. Harlow** (1992) Interaction between human cyclin A and adenovirus E1A-associated p107 protein. Science 255: 87-90.

**Fang, R., N.A. Santiago, L.C. Olds et E. Sihley** (2000) The homeodomain protein Cdx2 regulates lactase gene promoter activity during enterocyte differentiation. Gastroenterology 118: 115-127.

**Ferreira, R., L. Magnaghi-Jaulin, P. Robin, A. Harel-Bellan et D. Trouche** (1998) The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10493-10498.



**Fero, M.L., E. Randel, K. E. Gurley, J.M. Roberts et C.J. Kemp** (1998) The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. Nature 396 : 177-180.

**Fero, M.L., M. Rivkin, M. Tasch, P.Porter, C.E. Carow, E. Firpo, K. Polyak, L.H. Tsai, V. Broudy, R.M. Perlmutter, K. Kaushansky et J.M. Roberts** (1996) A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. Cell 85: 733-744.

**Flemington, E.K., S.H. Speck et W.G. Kaelin Jr** (1993) E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6914-6918.

**Flores-Rozas H., Z. Kelman, F.B. Dean, Z. Pan, W.J. Harper, S.J. Elledge, M. O'Donnell et J. Hurwitz** (1994) Cdk-interacting protein 1 directly bind with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase and holoenzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 8655-8659.

**Ford, A.M., C.A. Bennett, L.E. Healy, M. Towatari, M.F. Greaves et T. Enver** (1996) Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP alpha, -beta, and -delta during granulocyte-lineage specification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10838-10843.

**Fornace, A.J., D.W. Nebert, M.C. Hollander, J.D. Luethy, M. Papathanasiou, J. Fargnoli et N.J. Holbrook** (1989) Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. Mol. Cell. Biol. 9: 4196-4203.

**Franklin, D.S. et Y. Xiong** (1996) Induction of p18INK4c and its predominant association with CDK4 and CDK6 during myogenic differentiation. Mol. Biol. Cell. 7: 1587-1599.

**Fredersdorf, S., J. Burns, A.M. Milne, G. Packham, L. Fallis, C.E. Gillett, J.A. Royds, D. Peston, P.A. Hall, A.M. Hanby, D.M. Barnes, S. Shousha, M.J. O'Hare et X. Lu** (1997) High level expression of p27(kip1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: Inverse correlation between the expression of p27(kip1) and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 6380-6385.

**Frey, M.R., J.A. Clark, O. Leontieva, J.M. Uronis, A.R. Black et J.D. Black** (2000) Protein kinase C signaling mediates a program of cell cycle withdrawal in the intestinal epithelium. J. Cell. Biol. 151: 763-78.

**Friend, S.H., R. Bernards, S. Rogelj, R.A. Weinberg, J.M. Rapaport, D.M. Alberts et T.P. Dryja** (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature 323: 643-646

**Gartel, A.L., M.S. Serfas, M. Gartel, E. Goufman, G.S. Wu, W.S. El-Deiry et A.L. Tyner** (1996) p21(WAF1/CIP1) expression is induced in newly non-dividing cells in diverse epithelia and during differentiation of the Caco-2 intestinal cell line. Exp. Cell Res. 227: 171-181.

**Gaubatz, S., J.A. Lees, G.J. Lindeman et D.M. Libington** (2001) E2F-4 is exported from the nucleus in a CRM1-dependent manner. Mol. Cell. Biol. 21: 1384-1392.

**Gill RM, Hamel PA** (2000) Subcellular compartmentalization of E2F family members is required for maintenance of the postmitotic state in terminally differentiated muscle. J. Cell. Biol. 148: 1187-1201.

**Goethe, R. et P.V. Loc** (1994) The far upstream chicken lysozyme enhancer at -6.1 kilobase, by interacting with NF-M, mediates lipopolysaccharide-induced expression of the chicken lysozyme gene in chicken myelomonocytic cells. J. Biol. Chem. 269: 31302-31309.

**Green, C., R. Chatterjee, H.H.G. McGarridge, F. Ahmed et N.S.B. Thomas** (2000) p107 is active in the nucleolus in non-dividing human granulosa lutein cells. J. Mol. End. 25: 275-286.

**Greenbaum, L.E., W. Li, D.E. Cressman, Y. Peng, G. Ciliberto, V. Poli et R. Taub** (1998) CCAAT enhancer-binding protein  $\beta$  is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomie. J. Clin. Invest. 102: 996-1007.

**Gu, W., J.W. Schneider, G. Condorelli, S. Kaushal, V. Mahdavi et G.B. Nadal** (1993) Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. Cell 72: 309-324

**Guan K., C.W. Jenkins, Y. Li, M.A. Nichols, X. Wu, C.L. O'keefe, A.G. Matera et Y. Xiong** (1994) Growth suppression by p18, a p16<sup>INK4/MTS1</sup> and p14<sup>INK4/MTS2</sup> related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. Genes Dev. 8: 2939-2952.

**Hannon G.J. et D. Beach** (1994) p15<sup>INK4b</sup> is a potential effector of cell cycle arrest mediated by TGF- $\beta$ . Nature 371: 257-261.

**Hannon, G.J., D. Demetrick et D. Beach** (1993) Isolation of the Rb-related p130 through its interaction with CDK2 and cyclins. Genes Dev. 7: 2378-2391.

**Hara, E., R. Smith, D. Parry, H. Tahara, S. Stone et G. Peters** (1996) Regulation of p16<sup>CDKN2</sup> expression and its implication for cell immortalization and senescence. Mol. Cell. Biol. 16: 859-867.

**Harbour, J.W. et D.C. Dean** (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. Genes Dev. 14: 2393-2409.

**Harper, J.W., G. Adani, N. Wei, K. Keyomarsi et S. Elledge** (1993) The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 75: 805-816.

**Harper, J.W. et S.J. Elledge** (1996) Cdk inhibitors in development and cancer. Curr. Opin. Genet. Dev. 6: 56-64.

**Harvat, B.L., P. Seth et A.M. Jetten** (1997) The role of p27<sup>Kip1</sup> in gamma interferon-mediated growth arrest of mammary epithelial cells and related defects in mammary carcinoma cells. Oncogene 14: 2111-2122.

**Harvat, B.L., A. Wang, P. Seth et A.M. Jetten** (1998) Up-regulation of p27<sup>Kip1</sup>, p21<sup>WAF1/Cip1</sup> and p16<sup>INK4a</sup> is associated with, but not sufficient for, induction of squamous differentiation. J.Cell Sci. 111: 1185-1196.

**Hateboer, G., R.M. Kerkhoven, A. Shvarts, R. Bernards et R.L. Beijersbergen** (1996) Degradation of E2F by the ubiquitin-proteasome pathway: regulation by retinoblastoma family proteins and adenovirus transforming proteins. Genes Dev. 10: 2960-2970.

**Haubrich, W., F. Schaffner et J.E. Berk** (1995) Bockus Gastroenterology. Vol. 2, 5<sup>e</sup> édition, W.B. Saunders Company, Philadelphie, 1809 p.

**Hauser, P.J., D. Agrawal, M. Flanagan et W.J. Pledger** (1997) The role of p27<sup>Kip1</sup> in the *in vitro* differentiation of murine keratinocytes. Cell Growth Differ. 8: 203-211.

**Halevy, O., B.G. Novitch, D.B. Spicer, S.X. Skapek, J. Rhee, G.J. Hannon, D. Beach et A.B. Lassar** (1995) Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. Science 267: 1018-1021.

**Helin K., J.A. Lees, M. Vidal, N. Dyson, E. Harlow et A. Fattaey** (1992) A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. Cell 70: 337-350.

**Hendricks-Taylor, L.R. et G.J. Darlington** (1995) Inhibition of cell proliferation by C/EBP $\alpha$  occurs in many cell types, does not required the presence pf p53 or pRb and is not affected by the large T antigen. Nucleic Acids Res. 23: 4726-4733.

**Hengst, L., V. Dulic, J.M. Slingerland, E. Lees et S.I. Reed** (1994) A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5291-5295.

**Hengst, L. et S.I. Reed** (1996) Translational control of p27<sup>Kip1</sup> accumulation during the cell cycle. Science 271: 1861-1864.

**Hirai, H., M.F. Roussel, J. Kato, R.A. Ashmun et C.J. Sherr (1995)** Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. Mol. Cell. Biol. 15: 2672-2681.

**Hofmann, F., F. Martelli, D.M. Livingston et Z. Wang (1996)** The retinoblastoma gene product protects E2F-1 from degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. Genes Dev. 10: 2949-2959.

**Houde, M., P. Laprise, D. Jean, M. Blais, C. Asselin et N. Rivard (2001)** Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. J. Biol Chem. 276: 21885-21894.

**Hunter T. et J. Pines (1994)** Cyclins and cancer. II. Cyclin D and cdk inhibitors come of age. Cell 79: 573-582.

**Hurst, H.C. (1995)** Transcription factors 1: bZIP proteins. Protein Profile 2: 101-168.

**Hsu, W., T.K. Kerppola, P.L. Chen, T. Curran et S. Chen-Kiang (1994)** Fos and Jun repress transcriptional activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. Mol. Cell. Biol. 14: 268-276.

**Iavarone, A. et J. Massagué (1999)** E2F and histone deacetylase mediate transforming growth factor beta repression of cdc25A during keratinocyte cell cycle arrest. Mol. Cell. Biol. 19: 916-922.

**Ikeda, M., H. Orimo, H. Moriyama, E. Nakajima, N. Matsubara, R. Mibu, N. Tanaka, T., Shimada, A. Kimura et K. Shimizu (1998)** Close correlation between mutations of E2F4 and hMSH3 genes in colorectal cancers with microsatellite instability. Cancer Res. 58: 594-598.

**Johansen, L.M., I. Iwama, T.A. Lodie, K. Sasaki, D.W. Felsher, T.R. Golub et D.G. Tenen (2001)** c-myc is a critical target for C/EBP $\alpha$  in granulopoiesis. Mol. Cell. Biol. 21: 3789-3806.

**Johnson, D.G., J.K. Schwarz, W.D. Cress et J.R. Nevins (1993)** Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. Nature 365: 349-352.

**Jones, S.M. et A. Kazlauskas (2001)** Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. FEBS Lett. 490: 110-116.

**Kaelin Jr, W.G., W. Krek, W.R. Sellers, J.A. DeCaprio, F. Ajchenbaum, C.S. Fuchs, T. Chittenden, Y. Li, P.J. Farnham et M.A. Blonar (1992)** Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. Cell 70: 351-364.

**Kamp, A., N.A. Gruis, J. Weaver-Felfhaus, Q. Liu, K. Harshman, S.V. Tavtigian, E. Stockert, R.S. Day, B.E. Johnson et M.H. Skolnick** (1994) A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. Science 264: 436-440.

**Karam S.M.** (1999) Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. Front. Biosci. 4: 286-298.

**Kato, J.Y., M. Matsuoka, K. Polyak, J. Massagué et C.J. Sherr** (1994) Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. Cell 79: 487-496.

**Kiess M, Gill RM, Hamel PA** (1995) Expression and activity of the retinoblastoma protein (pRb)-family proteins, p107 and p130, during L6 myoblast differentiation. Cell Growth Differ. 6:1287-1298.

**Kim, S.H., K.A. Roth, C.M. Coopersmith, J.M. Pipas and J.I. Gordon** (1994) Expression of wild-type and mutant simian virus 40 large tumor antigen in villus-associated enterocytes of transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA 91: 6914-6918.

**Kinoshita, S., S. Akira et T. Kishimoto** (1992) A member of the C/EBP family, NF-IL6 beta, forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1473-1476.

**Kitzmann, M., M. Vandromme, V. Schaeffer, G. Carnac, J.-C. Labbé, N. Lamb et A. Fernandez** (1999) cdk1- and cdk2-mediated phosphorylation of MyoD Ser200 in growing C2 myoblasts: role in modulating MyoD half-life and myogenic activity. Mol. Cell. Biol. 19: 3167-3176.

**Kiyokawa, H., R.D. Kineman, T.K. Manova, V.C. Soares, E.S. Hoffman, M. Ono, D. Khanam, A.C. Hayday, A. Frohman et A. Koff** (1996) Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). Cell 85: 721-732.

**Kolligs, F.T., G. Bommer et B. Goke** (2002) Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. Digestion 66: 131-144.

**Kortylewski, M., P.C. Heinrich, A. Mackiewicz, U. Schniertshauer, U. Klingmuller, K. Nakajima, T. Hirano, F. Horn et I. Behrmann** (1999) Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. Oncogene 18: 3742-3753.

**Krek W., G. Xu et D.M. Livingston** (1995) Cyclin A-kinase regulation of E2F1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint. Cell 83: 1149-1158.

**Kuniyasu, H., W. Yasui, K. Kitahara, K. Naka, H. Yokozaki, Y. Akama, T. Hamamoto, H. Tahara et E. Tahara** (1997) Growth inhibitory effect of interferon-beta

is associated with the induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>Kip1</sup> in a human gastric carcinoma cell line. Cell Growth Differ. 8: 47-52.

**LaBaer, J., M.D. Garrett, L.F. Stevenson, J.M. Slingerland, C. Sandhu, H.S. Chou, A. Fattaey et E. Harlow** (1997) New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. Genes Dev. 11: 847-862.

**Landsberg, R.L., J.E. Sero, P.S. Danielian, T.L. Yuan, E.Y. Lee et J.A. Lees** (2003) The role of E2F4 in adipogenesis is independent of its cell cycle regulatory activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 2456-2461.

**Landschulz, W.H., P.F. Jonhson, E.Y. Adashi, B.J. Graves et S.L. McKnight** (1988) Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. Genes Dev. 2: 786-800.

**Laprise, P., P. Chailier, M. Houde, J.F. Beaulieu, M.J. Boucher et N. Rivard** (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. J. Biol. Chem. 277:8226-8234.

**LeClair, K.P., M.A. Blonar, et P.A. Sharp** (1992) The p50 subunit of NK- $\kappa$ B associates with the NK-IL6 transcription factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 8145-8149.

**LeCouter, J., P. Whyte et M. Rudnicki** (1996) Cloning and expression of the Rb-related mouse p130 mRNA. Oncogene 12: 1433-1440.

**Lee, W.H., R. Bookstein, F. Hong, L.J. Young, J.Y. Shew et E.Y. Lee** (1987) Human retinoblastoma susceptibility gene; cloning, identification, and sequence. Science 235: 1394-1399.

**Lee, E.Y., N. Hu, S.S. Yuan, L.A. Cox, A. Bradley, W.H. Lee et K. Herrup** (1994) Dual roles of the retinoblastoma protein in cell cycle regulation and neuron differentiation. Genes Dev. 8: 2008-2021.

**Lee, M.H., I. Reynisdottir et J. Massagué** (1995) Cloning of p57<sup>Kip2</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. Genes Dev. 9: 639-649.

**Lees, E., B. Faha, V. Dulic, S.I. Reed et E. Harlow** (1992) Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associates with p107 and E2F in a temporally distinct manner. Genes Dev. 6: 1874-1885.

**Lees, J.A., M. Saito, M. Vidal, M. Valentine, T. Look, E. Harlow, N. Dyson et K. Helin** (1993) The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. Mol. Cell. Biol. 13: 7813-7825.

**Lekstrom-Himes, J.A.** (2001) The role of C/EBP $\epsilon$  in the terminal stages of granulocyte differentiation. Stem Cells 19:125-133.

**Lekstrom-Himes, J. et K.G. Xanthopoulos** (1998) Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. J. Biol. Chem. 273: 28545-28548.

**Li Y., C. Graham, S. Lacy, A.M. Duncan et P. Whyte** (1993) The adenovirus E1A-associated 130-kDa protein is encoded by a member of the retinoblastoma gene family, and physically interacts with cyclins A and E. Genes Dev. 7: 2366-2377.

**Lin, F.-T. et M.D. Lane** (1992) Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. Genes Dev. 6:533-544.

**Lin, F.T., O.A. MacDougald, A.M. Diehl et M.D. Lane** (1993) A 30 kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  message: transcriptional activator lacking antimitotic activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 9606-9610.

**Lowenstein, C.J., E.W. Alley, P. Rayal, A.M. Snowman, S.H. Snyder, S.W. Russell et W.J. Murphy** (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 9730-9734.

**Luo, R.X., A.A. Postigo et D.C Dean** (1998) Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. Cell 92: 463-473.

**MacDougald, O.A. et M.D. Lane** (1995) Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. Annu. Rev. Biochem. 64: 345-373.

**MacKintosh, C., K.A. Beattie, S. Klumpp, P. Cohen et G.A. Codd** (1990) Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. FEBS Lett. 264, 187-192.

**Magnaghi-Jaulin, L., R. Groisman, I. Naguibneva, P.Robin, S. Lorain, J.P. Le Villain, F. Troualen, D. Trouche et A. Harel-Bellan** (1998) Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. Nature 391: 601-605.

**Mandal, M., D. Bandyopadhyay, T.M. Goepfert et R. Kumar** (1998) Interferon-induces expression of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21<sup>WAF1</sup> and p27<sup>Kip1</sup> that prevent activation of cyclin-dependent kinase by CDK-activating kinase (CAK). Oncogene 16: 217-225.

**Marti, A., C. Wibelauer, M. Scheffner et W. Krek** (1999) Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. Nat. Cell Biol. 1: 14-19.

**Martinez-Balbas, M.A., U.M. Bauer, S.J. Nielson, A. Brehm et T. Kouzarides** (2000) Regulation of E2F1 activity by acetylation. EMBO J. 19: 662-671.

**Matsuoka, S., M.C. Edwards, C. Bai, S. Parker, P. Zhang, A. Baldini, J.W. Harper et S.J. Elledge** (1995) p57<sup>Kip2</sup>, a structurally distinct member of p21<sup>Cip1</sup> CDK inhibitor family, is candidate tumor suppressor gene. Genes Dev. 9: 650-662.

**Mayol, X., J. Garriga et X. Grana** (1995) Cell-cycle dependent phosphorylation of p130. Oncogene 11: 801-808.

**Mayol, X., J. Garriga et X. Grana** (1996) G1 cyclin/CDK-independent phosphorylation and accumulation of p130 during the transition from G1 to G0 lead to its association with E2F-4. Oncogene 13: 237-246.

**Mayol, X., X. Grana, A. Baldi, N. Sang, Q. Hu et A. Giordano** (1993) Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain. Oncogene 8: 2561-2566.

**McKnight, S.L.** (2001) McBindall- A better name for CCAAT/enhancer-binding proteins? Cell 107: 259-261.

**Millard S.S., J.S. Yan, H. Nguyen, M. Pagano, H. Kiyokawa et A. Koff** (1997) Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. J. Biol. Chem. 272: 7093-7098.

**Miskimins, R., R. Srinivasan, M. Marin-Husstege, W.K. Miskimins et P. Casaccia-Bonnet** (2002) p27<sup>Kip1</sup> enhances myelin basic protein gene promoter activity. J. Neur. Res. 67: 100-105.

**Montgomery, R.K., E.H. Rings, J.F. Thompson, C.C. Schuijt, K.M. Aras, V.J. Wielenga, M.J. Kothe, H.A. Buller et R.J. Grand** (1997) Increased C/EBP in fetal rat small intestine precedes initiation of differentiation marker mRNA synthesis. Am. J. Physiol. 272: G534-G544.

**Morkel, M., J. Wenkel, A.J. Bannister, T. Kouzarides et C. Hagemeier** (1997) An E2F-like repressor of transcription. Nature 390 : 567-568.

**Morosetti, R., D.J. Park, A.M. Chumakov, I. Grillier, M. Shiohara, A.F. Gombart, T. Nakamaki, K. Weinberg et H.P. Koeffler** (1997) A novel, myeloid transcription factor, C/EBP epsilon, is upregulated during granulocytic, but not monocytic, differentiation. Blood 90: 2987-2994.

**Morrison, R.F. et S.R. Farmer** (1999) Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. J. Biol. Chem. 274: 17088-17097.



**Muller, C., M. Alunni-Fabbroni, E. Kowenz-Leutz, X. Mo, M. Tommasino et A. Leutz** (1999) Separation of C/EBPalpha-mediated proliferation arrest and differentiation pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7276-7281.

**Müller H. et K. Helin** (2000) The E2F transcription factors : key regulators of cell proliferation. Biochim. Biophys. Acta 1470: M1-M12.

**Mulligan, G. et T. Jacks** (1998) The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. Trends Genet. 14: 223-229.

**Munger, K., B.A. Werness, N. Dyson, W.C. Phelps, E. Harlow et P.M. Howley** (1989) Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. EMBO J. 8: 4099-4105.

**Nadal-Ginard, B.** (1978) Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA synthesis. Cell 15: 855-864.

**Nakajima, T., S. Kinoshita, T. Sasagawa, K. Sasaki, M. Naruto, T. Kishimoto et S. Akira** (1993) Phosphorylation et threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2207-2211.

**Nakayama, K., N. Ishida, M. Shirane, A. Inomata, T. Inoue, N. Shishido, I. Horii, D.Y. Loh et K. Nakayama** (1996) Mice lacking p27(Kip1) display increases body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. Cell 85: 707-720.

**New, L., Y. Jiang et J. Han** (2003) Regulation of PRAK subcellular location by p38 MAP kinases. Mol. Biol. Cell 14: 2603-2616.

**Nilsson, I et I. Hoffmann** (2000) Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. Prog. Cell Cycle Res. 4: 107-114.

**Nobori, T., K. Miura, D.J. Wu, A. Lois, K. Takabayashi et D.A. Carson** (1994) Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. Nature 368: 753-756.

**Nourse, J., E. Firpo, W.M. Flanagan, S. Coats, K. Polyak, M.H. Lee, J. Massague, G.R. Crabtree et J.M. Roberts** (1994) Interleukin-2-mediated elimination of the p27<sup>Kip1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. Nature 372: 570-573.

**Okamoto, A., D.J. Demetrick, E.A. Spillare, K. Hagiwara, S.P. Hussain, W.P. Bennett, K. Porrester, B. Gerwin, M. Serrano, D.H. Beach et C.C. Harris** (1994) Mutations and altered expression of p16<sup>INK4</sup> in human cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11045-11049.

**Olsen, E.N.** (1992) Interplay between proliferation and differentiation within the myogenesis lineage. Genes Dev. 4: 1454-1461.

Ossipow, V., P. Descombes et U. Schibler (1993) CCAAT/enhancer binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8219-8223.

Pagano M. S.W. Tam, A.M. Theodoras, P. Beer-Romero, G. Del Sal, V. Chau, P.R. Yew, G.F. Draetta et M. Rolfe (1995) Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. Science 269: 682-685.

Palmero, I., B. McConnell, D. Parry, S. Brookes, E. Hara, S. Bates, P. Jat et G. Peters (1997) Accumulation of p16<sup>INK4a</sup> in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status. Oncogene 15: 495-503.

Palmqvist, R., R. Stenling, A. Oberg et G. Lanberg (1998) Expression of cyclin D1 and retinoblastoma protein in colorectal cancer. Eur. J. Cancer 34: 1575-1581.

Paramio JM, Segrelles C, Casanova ML, Jorcano JL (2000) Opposite functions for E2F1 and E2F4 in human epidermal keratinocyte differentiation. J. Biol. Chem. 275: 41219-41226.

Pardee, A.B. (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. Science 246: 603-608.

Parry, D., S. Bates, D.J. Mann et G. Peters (1995) Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16<sup>INK4/MTS1</sup> tumor suppressor gene product. EMBO J. 14: 503-511.

Perreault, N. et J.F. Beaulieu (1996) Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human intestinal epithelial cell cultures. Exp. Cell Res. 224: 354-364.

Perreault, N. et J.F. Beaulieu (1998) Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. Exp. Cell Res. 245: 34-42.

Persengiev SP, Kondova II, Kilpatrick DL (1999) E2F4 actively promotes the initiation and maintenance of nerve growth factor-induced cell differentiation. Mol. Cell. Biol. 19: 6048-6056.

Poli, V. (1998) The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. J. Biol. Chem. 275: 27815-27822.

Poli, V., F.P. Mancini et R. Cortese (1990) IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. Cell 63: 643-653.

Polyak, K., J.Y. Kato, M.J. Solomon, C.J. Sherr, J. Massagué, J.M. Roberts et A. Koff (1994) p27<sup>Kip1</sup> a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor- $\beta$  and contact inhibition to cell cycle arrest. Genes Dev. 8: 9-22.

**Porse, B.T., T.A. Pederson, X. Xu, B. Lindberg, U.M. Wewer, L. Friis-Hansen et C. Nerlov** (2001) E2F repression by C/EBP $\alpha$  is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo. Cell 107: 247-258.

**Potten C.S. et M. Loeffler** (1990) Stem cells : attributes, cycle, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. Development 110: 1001-1020.

**Puri PL, Cimino L, Fulco M, Zimmerman C, LaThangue N, Giordano A, Graessmann A, Levrero M** (1998) Regulation of E2F4 mitogenic activity during terminal differentiation by its heterodimerization partners for nuclear translocation. Cancer Res. 58:1325-1331.

**Quaroni, A. et J.-F. Beaulieu** (1997) Cell dynamics and differentiation of conditionally immortalized human intestinal epithelial cells. Gastroenterology 113: 1198-1213.

**Quaroni, A., J.Q. Tian, P. Seth et C. Ap Rhys** (2000) p27(Kip1) is an inducer of intestinal epithelial cell differentiation. Am. J. Physiol. 279: C1045-1057.

**Ramji, D.P. et P. Foka** (2002) CCAAT/Enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. Biochem J. 365: 561-575.

**Ramji, D.P., A. Vitelli, F. Tronche, R. Cortese et G. Ciliberto** (1993) The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/NF-IL6 and C/EBP $\delta$ /NF-IL6 $\beta$ , are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms. Nucleic Acids Res. 21: 289-294.

**Rempel, R.E., M.T. Saenz-Robles, R. Storms, S. Morham, S. Ishida, A. Engel, L. Jakoi, M.F. Melhem, J.M. Pipas, C. Smith and J.R. Nevins** (2000) Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages. Mol. Cell 6: 293-306.

**Reynaud, E.G., M.P. Leibovitch, L.A.J. Tintignac, K. Pelpel, M. Guillier et S.A. Leibovitch** (2000) Stabilization of MyoD by direct binding to p57<sup>Kip2</sup>. J. Biol. Chem. 275: 18767-18776.

**Reynaud, E.G., K. Pelpel, M. Guillier, M.P. Leibovitch et S.A. Leibovitch** (1999) p57<sup>Kip2</sup> stabilizes MyoD protein by inhibiting cyclin E-cdk2 kinase activity in growing myoblasts. Mol. Cell. Biol. 19: 7621-7629.

**Rhoads, J.M., R.A. Argenzio, W. Chen, L.M. Graves, L.L. Licato, A.T. Bliksager, J. Smith, J. Gatzky et D.A. Brenner** (2000) Glutamine metabolism stimulates intestinal cell MAPKs by a cAMP-inhibitable, Raf-independent mechanism. Gastroenterology 118: 90-100.

**Rivard, N., M.-J. Boucher, C. Asselin et G. L'Allemain** (1999) MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. Am. J. Physiol. 277: C652-C664.

- Rivard, N., G. L'Allemain, J. Bartek et J. Pouyssegur** (1996) Abrogation of p27<sup>Kip1</sup> by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. J Biol Chem. 271: 18337-41.
- Rogers, S., R. Wells et M. Rechsteiner** (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science 234: 364-368.
- Roman, C., J.S. Platero, J. Shuman et K. Calame** (1990) Ig/EBP-1: a ubiquitously expressed immunoglobulin enhancer binding protein that is similar to C/EBP and heterodimerizes with C/EBP. Genes Dev. 4:1404-1415.
- Ron, D. et J.F. Habener** (1992) CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. Genes Dev. 6: 439-453.
- Schwarz, J.K., S.H. Devoto, E.J. Smith, S.P. Chellappan, L. Jakoi et J.R. Nevins** (1993) Interactions of the p107 and Rb proteins with E2F during the cell proliferation response. EMBO J. 12: 1013-1020.
- Sellers, W.R., J.W. Rodgers et W.G. Kaelin Jr** (1995) A potent transrepression domain in the retinoblastoma protein induces a cell cycle arrest when bound to E2F sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11544-11548.
- Serrano, M** (1997) The tumor suppressor protein p16<sup>INK4a</sup>. Exp. Cell Research 237: 7-13.
- Serrano, M., G.J. Hannon et D. Beach** (1993) A new regulation motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature 366: 704-707.
- Serrano, M., H. Lee, L. Chin, C. Cordon-Cardo, D. Beach et R.A. DePinho** (1996) Role of the Ink4a locus in tumor suppression and cell mortality. Cell 85: 27-37.
- Serrano, M., A. W. Lin, M.E. McCurrach, D. Beach et S.W. Lowe** (1997) Oncogenic *ras* provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16<sup>INK4a</sup>. Cell 88: 593-602.
- Servant, M.J., P. Coulombe, B. Turgeon et S. Meloche** (2000) Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenis and hypertrophis factors: Involvement of transcriptional ans posttranscriptional mechanisms. J. Cell. Biol. 148: 543-556.
- Sgambato, A., C. Ratto, B. Faraglia, M. Merico, R. Ardito, G. Schinzari, G. Romano et A.R. Cittadini** (1999) Reduced expression and altered subcellular localization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in human colon cancer. Mol. Carcinog. 26 : 172-179.

- Sheaff, R.J., M. Groudine, M. Gordon, J.M. Roberts et B.E. Clurman** (1997) Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. Genes Dev. 11: 1464-1478.
- Sherr, C.J.** (1994) G1 phase progression; cycling on cue. Cell 79;551-555.
- Sherr, C.J. et J.M. Roberts** (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. Genes Dev. 9: 1149-1163.
- Sherr, C.J. et J.M. Roberts** (1999) CDK inhibitors : Positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev. 13: 1501-1512.
- Skapek, S.X., J. Rhee, D.B. Spicer et A.B. Lassar** (1995) Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin-D1 dependent kinase. Science 267: 1022-1024.
- Slansky JE, Farnham PJ** (1996) Induction to the E2F family : protein structure and gene regulation. Curr. Topic Microbiol. Immunol. 208:1-30.
- Slomiany, B.A., K.L. D'Arigo, M.M. Kelly et D.T. Kurtz** (2000) C/EBP $\alpha$  inhibits cell growth via direct repression of E2F-DP-mediated transcription. Mol. Cell. Biol. 20: 5986-5997.
- Smith, E.J., G. Leone, J. DeGregori, L Jakoi et J.R. Nevins** (1996) The accumulation of an E2F-p130 transcriptional repressor distinguishes a G0 cell state from a G1 cell state. Mol. Cell. Biol. 16: 2252-2262.
- Song, A., Q. Wang, M.G. Goebel et M.A. Harrington** (1998) Phosphorylation of nuclear MyoD is required for its rapid degradation. Mol. Cell. Biol. 18: 4994-4999.
- Stein, B., P.C. Cogswell et A.S. Baldwin Jr** (1993) Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. Mol. Cell. Biol. 13: 3964-3974.
- Stevens, C. et N.B. La Thangue** (2003) E2F and cell cycle control; a double-edged sword. Arch. Biochem. Biophys. 412: 157-169.
- Stevens, C., L. Smith et N.B. La Thangue** (2003) Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. Nature Cell Biol. 5: 401-409.
- Stone, S., P. Jiang, P. Dayananth, S.V. Tavtigian, H. Katcher, D. Parry, G. Peters et A. Kamb** (1995) Complex structure and regulation of p16 (MTS1) locus. Cancer Res. 55: 2988-2994.
- Suh, E et P.G. Traber** (1996) An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. Mol. Cell. Biol. 16: 619-625.

**Suzuki, D.T., A.J.F. Griffiths, J.H. Miller et R.C. Lewontin** (1991) Introduction à l'analyse génétique. 4<sup>e</sup> édition. Éditions du Renouveau Pédagogique INC. Montréal. 768 p.

**Tahara, H., E. Sato, A. Noda et T. Ide** (1995) Increase in expression level of p21<sup>sdi1/cip1/waf1</sup> with increasing division age in both normal and SV40-transformed human fibroblasts. Oncogene 10: 835-840.

**Tanaka, T., N. Yoshida, T. Kishimoto et S. Akira** (1997) Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP $\beta$  and/or C/EBP $\delta$  gene. EMBO J. 16: 7432-7443.

**Tao, Y., R.F. Kassatly, D.W. Cress et J.M. Horowitz** (1997) Subunit composition determines E2F DNA-binding site specificity. Mol. Cell. Biol. 17: 6994-7007.

**Tetsu, O. et F. McCormick** (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. Nature 398: 422-426.

**Tian, J.Q. et A. Quaroni** (1999) Involvement of p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) in intestinal epithelial cell differentiation. Am. J. Physiol. 276: C1245-C1258.

**Timchenko, N.A., T.E. Harris, M. Wilde, T.A. Bilyeu, B.L. Burgess-Beusse, M.J. Finegold et G.J. Darlington** (1997) CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. Mol. Cell. Biol. 17 : 7353-7361.

**Timchenko, N.A., M. Wilde et G.J. Darlington** (1999) C/EBP $\alpha$  regulates formation of S-phase-specific E2F-p107 complexes in livers of newborn mice. Mol. Cell. Biol. 19: 2936-2945.

**Tintignac, L.A., M.P. Leibovitch, M. Kitzmann, A. Fernandez, B. Ducommun, L. Meijer et S.A. Leibovitch** (2000) Cyclin E-Cdk2 phosphorylation promotes late G1-phase degradation of MyoD in muscle cells. Exp. Cell Res. 259 : 300-307.

**Topley, G.I., R. Okuyama, J.G. Gonzales, C. Conti et G.P. Dotto** (1999) p21(Waf1/Cip1) functions as a suppressor of malignant skin tumor formation and a determinant of keratinocyte stem-cell potential. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 :9089-9094.

**Tortora, G.J. et S.R. Grabowski** (2001) Principes d'anatomie et de physiologie. Éditions du Renouveau Pédagogique. 9<sup>e</sup> Édition, Montréal, 1121 p.

**Toyoshima, H. et T. Hunter** (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity is related to p21. Cell 78: 67-74.

**Trautwein, C., C. Caelles, P. vander Geer, T. Hunter, M. Karin et M. Chojkier** (1993) Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its transactivation domain. Nature (London) 364: 544-547.

- Umek, R.M., A.D. Friedman et S.L. McKnight** (1991) CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. Science 251: 288-292.
- Vachon, P. et J.F. Beaulieu** (1992) Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. Gastroenterology 103: 414-423.
- Vachon, P. et J.F. Beaulieu** (1995) Extracellular heterotrimeric laminin promotes differentiation in human enterocytes. Am. J. Physiol. 268: G857-G867.
- Vairo, G., D.M. Livingston et D. Ginsberg** (1995) Functional interaction between E2F-4 and p130 : evidence for distinct mechanisms underlying growth suppression by different retinoblastoma protein family members. Genes Dev. 9: 869-881.
- Vallejo, M., D. Ron, C.P. Miller et J.F. Habener** (1993) C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CCAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response element. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4679-4683.
- Vernon, A.E., C. Devine et A. Philpott** (2003) The cdk inhibitor p27<sup>Xic1</sup> is required for differentiation of primary neurone in *Xenopus*. Development 130: 85-92.
- Vernon, A.E. et A. Philpott** (2003) A single cdk inhibitor, p27<sup>Xic1</sup>, functions beyond cell cycle regulation to promote muscle differentiation in *Xenopus*. Development 130: 71-83.
- Verona R, Moberg K, Estes S, Starz M, Vernon JP, Lees JA** (1997) E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. Mol. Cell. Biol. 17: 7268-7282.
- Vinson, C.R., P.F. Jonhson et S.L. McKnight** (1989) Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. Science 243: 1681-1688.
- Vlach, J., S. Hennecke et B. Amati** (1997) Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent inhibitor p27. EMBO J. 16: 5334-5344.
- Waga, S., G.J. Hannon, D. Beach et B. Stillman** (1994) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. Nature 369: 574-578.
- Wang, H. T. Goode, P.Iakova, J.H. Albrecht et N.A. Timchenko** (2002a) C/EBP $\alpha$  triggers proteasome-dependent degradation of cdk4 during growth arrest. EMBO J. 21: 930-941.
- Wang, H., P. Iakova, M. Wilde, A. Welm, T. Goode, W.J. Roesler et N.A. Timchenko** (2001) C/EBP $\alpha$  arrest cell proliferation through direct inhibition of cdk2 and cdk4. Mol Cell. 8: 817-824.

- Wang, Q., X. Wang, A. Hernandez, M.R. Dellmich, Z. Gatalica et B.M. Evers** (2002b) Regulation of TRAIL expression by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3 pathway in human colon cancer cells. J. Biol. Chem. 277: 36602-36610.
- Wegner, M., Z. Cao et M.G. Rosenfeld** (1992) Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP $\beta$ . Science 256: 370-373.
- Wei, Q., W.K. Miskimins et R. Miskimins** (2003) The Sp1 family of transcription factors is involved in p27<sup>Kip1</sup>-mediated activation of myelin basic protein gene expression. Mol. Cell. Biol. 23: 4035-4045.
- Weinberg, R.A.** (1991) Tumor suppressor genes. Science 254: 1138-1146.
- Weinberg, R.A.** (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell 81: 323-330.
- Weintraub, S.J., K.N. Chow, R.X. Luo, S.H. Zhang, S. He et D.C. Dean** (1995) Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. Nature 375: 812-815.
- Weintraub, H., S.J. Tapscott, R.L. Davis, M.J. Thayer, M.A. Adam, A.B. Lassar et A.D. Miller** (1989) Activation of muscle specific gene in pigment, nerve, fat, liver and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5434-5438.
- Wells, J.M., S. Illenye, J. Magae, C.L. Wu et N.H. Heintz** (1997) Accumulation of E2F-4.DP-1 DNA binding complexes correlates with induction of dhfr gene expression during the G1 to S phase transition. J. Biol. Chem. 272: 4483-4492.
- Welm, A.L., N.A. Timochenko et G.J. Darlington** (1999) C/EBP $\alpha$  regulates generation of C/EBP $\beta$  isoforms through activation of specific proteolytic cleavage. Mol. Cell. Biol. 19: 1695-1704.
- Whyte, P., K.J. Buchkovich, J.M. Horowitz, S.H. Friend, M. Raybuck, R.A. Weinberg et E. Harlow** (1988) Association between an oncogene and an anti-oncogene: The adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. Nature 334: 124-129.
- Whyte, P., N.M. Williamson et E. Harlow** (1989) Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. Cell 56: 67-75.
- Williams, S.C., C.A. Cantwell et P.F. Jonhson** (1991) A family of C/EBP related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers *in vitro*. Genes Dev. 5: 1553-1567.



- Xiong, Y., H. Zhang et D. Beach** (1993) Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinase is associated with cellular transformation. Genes Dev. 7: 1572-1583.
- Xu M., K.A. Sheppard, C.Y. Peng, A.S. Yee et H. Piwnica-Worms** (1994) Cyclin A/cdk2 binds directly to E2F1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F1/DP1 by phosphorylation. Mol. Cell. Biol. 14: 8420-8431.
- Yamanaka, R., G.D. Kim, H.S. Radomska, J. Lekstrom-Himes, L.T. Smith, P. Antonson, D.G. Tenen et K.G. Xanthopoulos** (1997) CCAAT/enhancer-binding protein  $\epsilon$  is preferentially up-regulated during granulocyte differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential slicing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6462-6467.
- Yamamoto, H., J.-W. Soh, H. Shirin, W.-Q. Xing, J.T. Lim, Y. Yao, E. Slosberg, N. Tomita, I. Schieren et I.B. Weinstein** (1999) Comparative effects of overexpression of p27<sup>Kip1</sup> and p21<sup>Cip1/Waf1</sup> on growth and differentiation in human colon carcinoma cells. Oncogene 18: 103-115.
- Yan, Y., J. Frisén, M.H. Lee, J. Massagué et M. Barbacid** (1997) Ablation of the Cdk inhibitor p57<sup>Kip2</sup> results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. Genes Dev. 11: 973-983.
- Yeh, W.-C., Z. Cao, M. Classon et S.L. McKnight** (1995) Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. Genes Dev. 9: 168-181.
- Zamanian, M et N.B.L. La Thangue** (1993) Transcriptional repression by the Rb-related protein p107. Mol. Biol. Cell 4: 389-396.
- Zhang, H.S., M. Gavin, A. Dahiya, A.A. Postigo, D. Ma, R.X. Luo, J.W. Harbour et D.C. Dean** (2000) Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. Cell 101: 79-89.
- Zhang, P., A. Iwama, M.W. Datta, G.J. Darlington, D.C. Link et D.G. Tenen** (1998) Upregulation of interleukin 6 and granulocyte colony-stimulating factor receptors by transcription factors CCAAT enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) is critical for granulopoiesis. J. Exp. Med. 188: 1173-1184.
- Zhang, P., N.J. Liegeois, C. Wong, M. Finegold, H. Hou, J.C. Thompson, A. Silverman, J.W. Harper, R.A. DePinho et S.J. Elledge** (1997) Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57<sup>Kip2</sup> indicates a role in Beckwith-Wiedeman syndrome. Nature 387: 151-158.
- Zhang, P., C. Wong, R.A. DePinho, J.W. Harper et S.J. Elledge** (1998) Cooperation between the Cdk inhibitors p27(Kip1) and p57(Kip2) in the control of tissue growth and development. Genes Dev. 12: 3162-3167.

**Zhang, P., C. Wong, D. Liu, M. Finegold, J.W. Harper et S.J. Elledge** (1999) p21<sup>Cip1</sup> and p57<sup>Kip2</sup> control muscle differentiation at the myogenin step. Genes Dev. 13: 213-224.

**Zhu, L., E. Harlow et B.D. Dynlacht** (1995) p107 uses a p21<sup>Cip1</sup>-related domain to bind to cyclin/cdk2 and regulate interactions with E2F. Genes Dev. 9: 1740-1752.

**Zhu, L., S. van den Heuvel, K. Helin, A. Fattawey, M. Ewen, D. Livingston, N. Dyson et E. Harlow** (1993) Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. Genes Dev. 7: 1111-1125.

**Zhu, S., K. Yoon, E. Sterneck, P.F. Johnson et R.C. Smart** (2002) CCAAT/enhancer-binding protein- $\beta$  is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic ras signalling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 207-212.

**Zindy, F., D.E. Quelle, M.F. Roussel et C.J. Sherr** (1997) Expression of the p16<sup>INK4a</sup> tumor suppressor *versus* other INK4 family members during mouse development and aging. Oncogene 15: 203-211.